Caracterización de astrocitos neurotóxicos aislados del modelo murino 3×Tg-AD sintomático como potencial blanco terapéutico en la Enfermedad de Alzheimer

Msc. Diego Carvalho Álvarez

Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas – Sub-área Neurociencias

Universidad de la República

Ministerio de Educación y Cultura – Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Centro Uruguayo de Imagenología Molecular

Montevideo – Uruguay

Mayo de 2023

Caracterización de astrocitos neurotóxicos aislados del modelo murino 3×Tg-AD sintomático como potencial blanco terapéutico en la Enfermedad de Alzheimer

Msc. Diego Carvalho Álvarez

Tesis de doctorado presentada al Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas – sub-área Neurociencias, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Directores de Tesis:

Dr. Juan A. Abin Carriquiry

Codirectores:

Dra. Florencia Arredondo

Dr. Pablo Díaz Amarilla

Montevideo – Uruguay

Mayo de 2023

Integrantes del tribunal de defensa de tesis

Dra. Patricia Cassina

Dra. Patricia Lagos

Dr. Pablo Smircich

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que contribuyeron de diversas formas a mi formación durante la realización de este doctorado, incluyendo a mis directores de tesis Florencia Arredondo, Juan A. Abin Carriquiry y Pablo Díaz Amarilla. Agradezco a Young Mi-Go y Dean Jones por recibirme en su laboratorio y permitirme realizar el análisis metabolómico de astrocitos, a Ryan Smith por guiarme y ayudarme en ese proceso, y a todo el equipo de la Universidad de Emory por su cálida bienvenida. Quiero agradecer a la gente de CUDIM por recibirme, en especial a Florencia Arredondo, Rosina Dapueto, Victoria Boix y Daniela Santi por su incansable esfuerzo y colaboración con los ensayos experimentales, así como a Pablo Díaz, quien fue responsable de que esta línea de investigación exista. También agradezco a Olivier Chevallier de la Queen's University Belfast y a Marcela Martinez de la plataforma analítica del IIBCE por su ayuda con el procesamiento de muestras para estudios preliminares de metabolómica. También deseo agradecer a mi familia por su apoyo y comprensión, así como a todos los amigos y compañeros que me han acompañado a lo largo de estos años.

Agradezco a las organizaciones y personas que hicieron posible esta tesis mediante el financiamiento de diversos rubros: PEDECIBA (becas de posgrado, beca de movilidad capacitación), ANII (beca nacional de posgrado POS_NAC_2017_1_140673, beca de movilidad capacitación MOV_CA_2018_1_149736), CAP (beca de finalización de posgrado), IIBCE - Departamento de Neuroquímica, Plataforma Analítica IIBCE (detección de aminoácidos en muestras de astrocitos) y CUDIM (financiamiento de estudios transcriptómicos).

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia. Actualmente afecta a alrededor del 5-10% de las personas mayores de 65 años y se espera que su prevalencia mundial se triplique para 2050. Las terapias actuales han mostrado efectos paliativos a nivel sintomático, cuya eficacia depende del grado de progresión de la enfermedad. Por tanto, es de interés la identificación de nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores tempranos.

Evidencias recientes sugieren el posible papel patogénico de diferentes células gliales, tales como los astrocitos, en el desarrollo de la EA y otros trastornos neurodegenerativos. A través de un proceso llamado astrogliosis reactiva, estas células sufren cambios morfológicos y funcionales en respuesta a señales de daño tisular y otros estímulos presentes en entornos patológicos. Los estudios de modelos humanos y murinos sugieren que estas respuestas son complejas y heterogéneas, y pueden manifestarse como fenotipos de astrocitos específicos de la enfermedad.

En el contexto de nuestra línea de investigación con el modelo murino triple transgénico de la EA (3xTg-AD, basado en la expresión de tres genes mutantes asociados a la EA familiar), se aislaron astrocitos de la corteza e hipocampo de animales sintomáticos que resultaron neurotóxicos para las neuronas corticales-hipocampales en cultivo. Este efecto se produce tanto en el cocultivo de astrocitos-neuronas como por su medio acondicionado y recuerda a otros fenotipos de astrocitos neurotóxicos observados en la isquemia, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o a los llamados astrocitos A1.

En esta tesis profundizamos en la caracterización de estos astrocitos neurotóxicos, tanto a nivel metabolómico como transcriptómico. Asimismo, en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para la enfermedad, se evaluó el potencial de flavanonas naturales para revertir el fenotipo neurotóxico de estas células así como para proteger a las neuronas del daño causado por su medio condicionado.

Los resultados de los estudios ómicos indican que los astrocitos neurotóxicos 3xTg-AD muestran varias características de reactividad, incluidas alteraciones de la matriz extracelular y la liberación de factores proinflamatorios y proliferativos que podrían tener efectos nocivos sobre las neuronas. También se destacan alteraciones en el metabolismo energético y el metabolismo de los neurotransmisores glutamato y GABA. El conjunto de estas alteraciones podrían ser consecuencia de respuestas de estrés en el retículo endoplásmico (ER) y las mitocondrias, así como de adaptaciones metabólicas concomitantes.

Esta tesis apoya la hipótesis de que los cambios adaptativos en la función astrocítica, inducidos por un microambiente bajo estrés, podrían promover fenotipos de astrocitos nocivos y acelerar o inducir aún más los procesos neurodegenerativos. Asimismo, demostramos que es posible modular el fenotipo de estas células utilizando compuestos neuroprotectores de origen natural, evidenciando también el potencial de estas intervenciones en la EA.

Palabras clave: ratones 3xTg-AD, astrocitos, neurodegeneración, enfermedad de Alzheimer, transcriptómica, metabolómica, flavonoides.

Tabla de contenidos

I. INTRODUCCIÓN 11

1. Enfermedad de Alzheimer 11

1.1. Hipótesis amiloide y tau de la fisiopatología de la EA 12

1.2. Hipótesis complementarias y alternativas de la EA 16

1.3. Participación de los astrocitos en la EA 19

1.3.1. Interacción de astrocitos con el péptido amiloide y sus agregados 24

1.3.2. EA y alteraciones metabólicas en astrocitos 25

1.3.3. EA y alteraciones de neurotransmisores en astrocitos 27

1.4. Senescencia celular en la EA 28

2. Antecedentes particulares 31

2.1. Astrocitos con fenotipo neurotóxico asociados a enfermedades neurodegenerativas 31

2.2. Modelo murino triple transgénico de la EA (3xTg-AD) 34

2.2.1. Astrocitos neurotóxicos aislados del modelo 3xTg-AD sintomático 37

II. HIPÓTESIS 40

III. OBJETIVOS 41

IV. CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA 41

1. Fundamentos de transcriptómica 42

1.1. Adquisición de datos 43

1.2. Preprocesamiento de datos 44

1.2.1. Control de calidad 44

1.2.2. Alineamiento 45

1.2.3. Cuantificación 45

1.3. Análisis de expresión diferencial 46

1.3.1. Normalización 46

1.3.2. Análisis estadísticos 48

1.4. Análisis funcional 50

1.4.1. Anotación 50
1.4.2. Análisis de rutas 51
2. Estrategia experimental (transcriptómica) 52
3. Resultados y discusión (transcriptómica) 54
3.1. Características globales del perfil transcriptómico de astrocitos Tg.Old 54
3.1.1. Expresión de marcadores astrocíticos y marcadores asociados a reactividad 55
3.2. Análisis de ontología y vías de señalización alteradas en el transcriptoma de astrocitos Tg.Old 58
3.3. Alteraciones transcripcionales asociadas con características proinflamatorias y proliferativas 61
3.4. Alteraciones transcripcionales asociadas al metabolismo biosintético y energético 63
3.5. Interacción entre respuestas de estrés y adaptaciones funcionales 66
3.5.1. Rasgos senescentes en astrocitos Tg.Old 69
V. CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA 71
1. Fundamentos de metabolómica 71
1.1. Plataformas analíticas 72
1.2. Extracción y preprocesamiento de datos 73
1.3. Pretratamiento de datos: normalización e imputación de valores perdidos 75
1.4. Análisis estadísticos 77
1.5. Anotación 78
1.6. Análisis de rutas 82
1.7. Limitaciones 85
2. Estrategia experimental (metabolómica) 87
3. Resultados y discusión (metabolómica) 90
3.1. Características globales del perfil metabolómico de astrocitos Tg.Old 90

3.2. Asociaciones entre vías metabólicas y de señalización alteradas... 92
3.2.1. Alteraciones clave involucradas en vías de señalización y metabolismo energético de los astrocitos 96
VI. ESTUDIO DE ESTRATEGIAS PARA REVERTIR EL FENOTIPO NEUROTÓXICO ASTROCITARIO....99
1. Fundamento teórico: tratamientos para la EA 100
1.1. Tratamiento alopático 100
1.2. Terapias dirigidas a la patología amiloide y tau 100
1.3. Estrategias antiinflamatorias....102
1.4. Tratamientos de reposicionamiento: tratamientos anticancerígenos, tratamientos antidiabéticos....103
1.5. Productos naturales, estrategias multidiana y neuroprotectoras... 105
1.6. Senolíticos....106
1.7. Estrategias complementarias....106
2. Estrategia experimental (neuroprotección por flavanonas preniladas)....108
3. Resultados y discusión (neuroprotección por flavanonas preniladas)....110
3.1. Efecto protector frente a la neurotoxicidad mediada por medio condicionado de astrocitos Tg.Old....110
3.2. Evaluación *in silico* e *in vitro* de la actividad inhibitoria del compuesto 1 sobre la fosforilación de tau dependiente de GSK-3β... 112
3.3. Reducción de la sobrevida y toxicidad del astrocitos Tg.Old tratados con compuesto 1....115
VII. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS....118
1. Aportes del estudio de los astrocitos neurotóxicos 3xTg-AD a la comprensión de la fisiopatología de la EA 118

2. Oportunidades de investigación y desafíos ante la complejidad de la respuesta astrocitaria en la EA 119
3. Caracterización del secretoma astrocitario e identificación del agente neurotóxico 120
4. Desarrollo de nuevos modelos *in vitro* de astrocitos; reevaluación y o desarrollo de nuevos modelos de la EA 121
5. Integración de modelos y estrategias de análisis 122
6. Los astrocitos como potencial blanco terapéutico ... 122

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 124

IX. APÉNDICES 195

1. Publicaciones científicas y manuscritos de publicación asociados a la tesis 195
   1.1. Publicación transcriptómica: "*Transcriptomic analyses of neurotoxic astrocytes derived from adult triple transgenic Alzheimer's disease mice*", Carvalho et al. 2023 195
      1.1.1. Material suplementario 1 publicación transcriptómica ... 244
      1.1.2. Material suplementario 2 publicación transcriptómica ... 244
      1.1.3. Material suplementario 3 publicación transcriptómica ... 244
   1.2. Manuscrito metabolómica: "*Untargeted Metabolomics of 3xTg-AD Neurotoxic Astrocytes*", Carvalho et al. 2023 245
      1.2.1. Material suplementario 1 manuscrito metabolómica 268
      1.2.2. Material suplementario 2 manuscrito metabolómica 268
   1.3. Manuscrito neuroprotección por flavanonas preniladas: "*Prenylated flavanone isolated from Dalea species as a potential multitarget-neuroprotector in an in vitro Alzheimer's disease mice model*", Santi et al. 2023 269

1.3.1. Material suplementario 1 manuscrito neuroprotección por flavanonas preniladas. 295

X. ANEXOS. 296

2. Publicaciones científicas vinculadas a la tesis. 296

2.1. Publicación aislamiento y caracterización astrocitos 3xTgAD neurotóxicos: "*Isolation and characterization of neurotoxic astrocytes derived from adult triple transgenic Alzheimer's disease mice*", Diaz-Amarilla et al. 2022. 296

2.2. Publicación efecto neuroprotetor de flavanonas preniladas: "*Neuroprotective effects of prenylated flavanones isolated from Dalea species, in vitro and in silico studies*", Santi et al. 2020 308

I. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva e irreversible identificada por primera vez en 1901 por el Dr. Alois Alzheimer. Es la forma más común de demencia (50% a 75%) y su prevalencia aumenta con la esperanza de vida, afectando a un número estimado de 50 millones de personas en todo el mundo (Alzheimer's Disease International., 2020, 2022; Lynch & Alzheimer's Disease International., 2019; M. J. Prince et al., 2015). La misma se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo que incluye principalmente pérdida de memoria y puede ir acompañado de apatía y depresión. Este continuo deterioro da como resultado problemas de comunicación, desorientación, confusión, falta de juicio, cambios de comportamiento y, en última instancia, dificultad para hablar, tragar y caminar (Alzheimer's Association, 2019). En función de su edad de aparición, la EA se clasifica en EA de inicio temprano o precoz (aparición < 65 años) y EA de inicio tardío (aparición ≥ 65 años), representando esta última la gran mayoría de los casos (Reitz & Mayeux, 2014). Si bien son clínicamente indistinguibles, la EA precoz generalmente se asocia con un ritmo de progresión más rápido y un patrón de herencia mendeliano.

Histopatológicamente, la EA se caracteriza por la acumulación cerebral de depósitos extracelulares (placas seniles) de agregados del péptido beta-amiloide (Aβ) y ovillos neurofibrilares intra-neuronales de la proteína tau hiperfosforilada (Alzheimer's Association, 2019; Reitz & Mayeux, 2014) (figura 1). Estas características histopatológicas comienzan en el lóbulo temporal y se extienden al hipocampo, así como a las cortezas frontal, parietal y occipital (Deture & Dickson, 2019). Los dos tipos de lesiones se originarían de forma independiente en distintas regiones del cerebro, apareciendo primero los ovillos (Price & Morris, 1999). La evaluación post mortem de estos rasgos se utiliza para el diagnóstico definitivo de la enfermedad, por lo que la identificación de marcadores de diagnóstico temprano es un área importante de investigación. Existe evidencia de que la pérdida neuronal y otras alteraciones relacionadas ya se encuentran presentes en la etapa de deterioro cognitivo leve de la enfermedad, con depósitos de Aβ acumulados más de una década antes del diagnóstico clínico (De Strooper & Karran, 2016; Sperling et al., 2014). Además de la pérdida sináptica y neuronal, se observa estrés oxidativo generalizado, daño mitocondrial, desregulación de neurotransmisores y neuroinflamación (Querfurth & LaFerla, 2010).

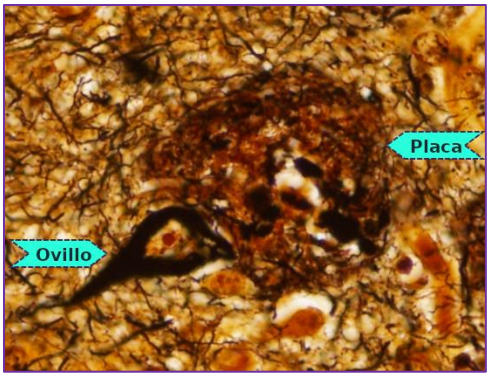


Figura 1. Depósitos de placas amiloide y ovillos de proteína tau hiperfosforilada en la EA. Tomado de *neuropathology-web.org*.

Actualmente no existen tratamientos para curar o detener la progresión de la EA. Los tratamientos disponibles incluyen inhibidores de la acetilcolinesterasa (p. ej., donezepil, galantamina, rivastigmina) y antagonistas del receptor NMDA (memantina), que en el mejor de los casos solo retrasan la progresión de los síntomas cognitivos y conductuales. Investigaciones más recientes han mostrado resultados prometedores utilizando medicamentos desarrollados originalmente para tratar la diabetes o el cáncer, tal como la insulina y los análogos del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) así como de anticuerpos dirigidos a Aβ (Bomfim et al., 2012; Hölscher, 2014; McClean & Hölscher, 2014; Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020) (Ver sección *Tratamientos para la EA*).

1.1. Hipótesis amiloide y tau de la fisiopatología de la EA

La hipótesis de la cascada amiloide postula que el péptido Aβ, en una variedad de formas, es el agente causal de una cascada de eventos celulares y tisulares que resultan en las presentaciones patológicas características de la enfermedad, ocasionan daño sináptico y, en última instancia muerte neuronal y demencia (Querfurth & LaFerla, 2010). Si bien inicialmente se consideró a las placas de Aβ como las principales entidades patogénicas, más recientemente se ha sugerido que los agregados en protofibrillas u oligómeros pueden ser los verdaderos agentes neurotóxicos (Cleary et al., 2004; Lacor et al., 2007). La evidencia a favor de la hipótesis amiloide proviene principalmente de las formas precoces hereditarias de la enfermedad. En particular, tres genes (APP, PSEN1 y PSEN2) que codifican proteínas involucradas en la generación de Aβ a partir del corte de la proteína APP (proteína precursora amiloide), han sido implicados en el desarrollo de la EA precoz (Tcw & Goate, 2017). De manera similar, las personas con síndrome de Down tienen una tercera copia de APP y con frecuencia desarrollan los signos histopatológicos y clínicos típicos de la enfermedad, incluso a edades tempranas. Se han informado más de 30 mutaciones asociadas con la EA en el gen APP. Las mutaciones “tipo London” provocan un ligero aumento en la producción de Aβ y un inicio más temprano de la patología que las mutaciones “tipo sueco”. Estas últimas inducen un mayor aumento de la proteína, sugiriendo otros mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad (Pimplikar et al., 2010). Además, se han informado variantes de APP que protegen contra la EA (Jonsson et al., 2012). Los ratones transgénicos que albergan mutaciones humanas en APP y PSEN recapitulan muchas de las características de la enfermedad

humana, aunque no todas, y las líneas celulares que portan mutaciones en APP sobreexpresan Aβ (LaFerla & Green, 2012).

APP es una proteína transmembrana con un rol importante en la homeostasis neuronal, como por ejemplo en la regulación de la neurotransmisión, la plasticidad sináptica, y la exportación de hierro (G. F. Chen et al., 2017). Esta consta de un único dominio que atraviesa la membrana, un gran extremo N glicosilado extracelular y un extremo C citoplasmático más corto (ver detalles en figura 2). El corte enzimático de la proteína produce péptidos beta amiloideos de 36, 43 o más aminoácidos de longitud (G. F. Chen et al., 2017; Chow et al., 2009). Este proceso puede ser realizado por tres tipos de enzimas: α-, β- y γ-secretasas. Las α-secretasas son enzimas de la familia ADAM (*a desintegrin and metalloprotease*), como ADAM9, ADAM10 y ADAM17 (Chow et al., 2009). La β-secretasa o BACE1 (*β-site APP cleaving enzyme 1*) es una proteasa transmembrana localizada dentro de la red trans-Golgi y el compartimento endosomal (Kandalepas & Vassar, 2012). Aunque BACE1 llega a la membrana plasmática, el procesamiento primario de APP mediado por BACE1 se produce en vesículas endocíticas. No se conocen mutaciones causantes de la enfermedad en el gen que codifica BACE1. La γ-secretasa es un complejo proteico compuesto por presenilina 1 (PSEN1) o presenilina 2 (PSEN2), nicastrina, APH1 (*anterior pharynx defective 1*) y potenciador de presenilina 2 (PEN2) (Iwatsubo, 2004).

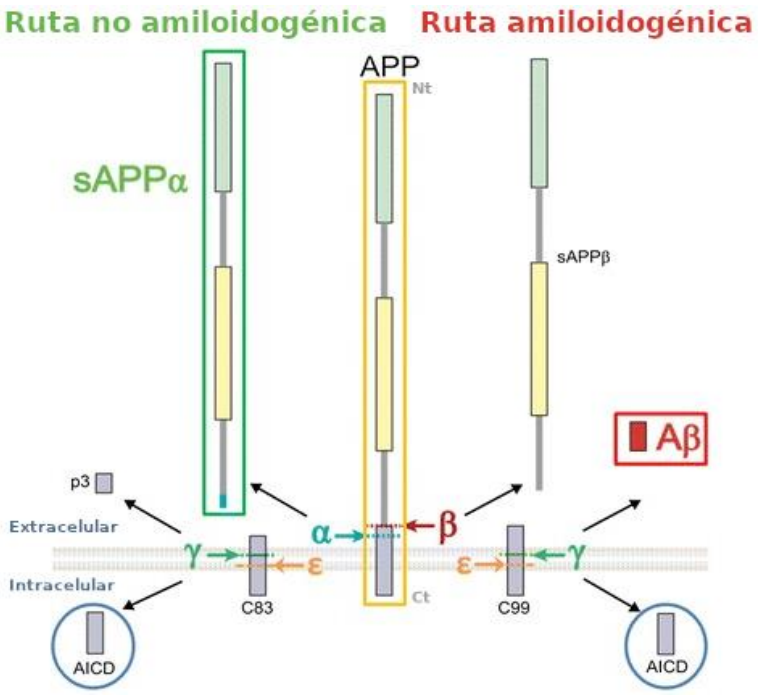


Figura 2. Rutas de procesamiento del péptido amiloide. La proteína precursora de amiloide (APP) puede ser cortada por dos vías. En la denominada vía amiloidogénica, la APP es escindida por la β-secretasa (BACE1, *beta-site APP cleaving enzyme 1*) y las enzimas γ-secretasa (PSEN1 es el núcleo catalítico del complejo multiproteico γ-secretasa). La escisión inicial de la β-secretasa produce un gran dominio extracelular soluble, la proteína β precursora de amiloide secretada (sAPPβ). A continuación, el fragmento restante C99 unido a la membrana se escinde mediante cortes secuenciales por γ-secretasa. Estos comienzan cerca de la membrana interna en un sitio de escisión de la γ-secretasa epsilon (el sitio ε) para producir el dominio intracelular APP (AICD), y luego los

siguientes cortes de esta enzima liberan el componente restante unido a la membrana para producir péptidos Aβ de diferente longitud incluyendo Aβ43, Aβ42, Aβ40 y Aβ38 (Dimitrov et al., 2013). En la llamada vía no amiloidogénica, la APP es procesada consecutivamente por la α y γ secretasas para producir la proteína precursora de amiloide secretada α (sAPPα), p3 (que en efecto es Aβ17-40/42) y AICD. La principal enzima α-secretasa es la ADAM10 (*A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*). La escisión a través de vías amiloidogénicas y no amiloidogénicas depende de la localización celular de las enzimas de escisión y de la APP de longitud completa, que se expresan y trafican en ubicaciones subcelulares específicas. Adaptado de (G. P. Morris et al., 2014).

En la vía no amiloidogénica, la APP es procesada principalmente por la α- y γ- secretasas (figura 2). El primer corte libera sAPPα de la superficie celular y deja un fragmento APP C-terminal de 83 aminoácidos (C83, α-CTF). El corte intramembrana de C83 por γ-secretasa libera el péptido P3 (3 kDa). De manera similar, el procesamiento amiloidogénico de APP implica cortes secuenciales por β- y γ-secretasa. El primer corte libera sAPPβ de la superficie celular y deja un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos de APP (C99, β-CTF). Este fragmento de membrana puede internalizarse y procesarse aún más por la γ-secretasa en múltiples sitios para producir fragmentos de escisión de 43 (Aβ43) o más aminoácidos que se recortan aún más en compartimentos endocíticos. Las principales formas finales de Aβ (4 kDa) son el péptido Aβ de 40 aminoácidos (Aβ40) y el péptido Aβ de 42 aminoácidos (Aβ42) más insoluble. El corte de C99 por γ-secretasa libera un dominio intracelular APP (AICD, *APP intracellular domain*, no confundir con *Activation-induced cell death*) que puede regular la expresión génica, la apoptosis y otros procesos (Kögel et al., 2012; Müller et al., 2008).

Las mutaciones genéticas asociadas con el procesamiento de APP pueden conducir a niveles elevados de Aβ o a un aumento relativo de las formas Aβ42 y Aβ43 sobre la forma Aβ40. Se piensa que esto potencia la agregación de la proteína en varios tipos de ensamblajes, incluidos oligómeros, protofibrillas y fibrillas de amiloide (Dimitrov et al., 2013). Las fibrillas de amiloide son más grandes e insolubles, y pueden ensamblarse en placas de amiloide, mientras que los oligómeros de amiloide son solubles y pueden diseminarse por todo el cerebro.

Se estima que los agregados oligoméricos de la proteína β-amiloide son tóxicos al unirse a una variedad de receptores, incluidos los receptores de neurotrofina p75 (p75NRT), ácido N-metil-D-aspártico (NMDAR), factor de crecimiento nervioso (NGF), insulina, receptores Frizzled y la proteína priónica celular (PrPc) (Sakono & Zako, 2010) (figura 3). Por ejemplo Aβ puede interactuar directa o indirectamente con el receptor NMDAR promoviendo una cadena de desregulación del calcio, disfunción mitocondrial y muerte neuronal (Alberdi et al., 2010). El receptor de acetilcolina α7nAChR es otro candidato para su unión; *in vitro* facilita su acumulación neuronal y la fosforilación de tau (R. G. Nagele et al., 2002; H. Y. Wang et al., 2000, 2003). El receptor p75NTR es un receptor de baja afinidad de la familia TNF para las neurotrofinas. Aβ se une tanto a los monómeros como a los trímeros de p75NTR, activando cascadas apoptóticas en células de neuroblastoma humanas (Hashimoto et al., 2004). Además, puede interactuar sinérgicamente con las citoquinas TNF-α e IL-1β, fortaleciendo los efectos neurotóxicos de la señalización por p75NTR (Perini et al., 2002). Asimismo, Aβ podría contribuir al daño celular fomentando la peroxidación lipídica y la generación de radicales libres (Cheignon et al., 2018; Z.

X. Yao et al., 1999). También se han identificados mecanismos independientes de Aβ mediados por APP en la mitocondria (Devi et al., 2006).

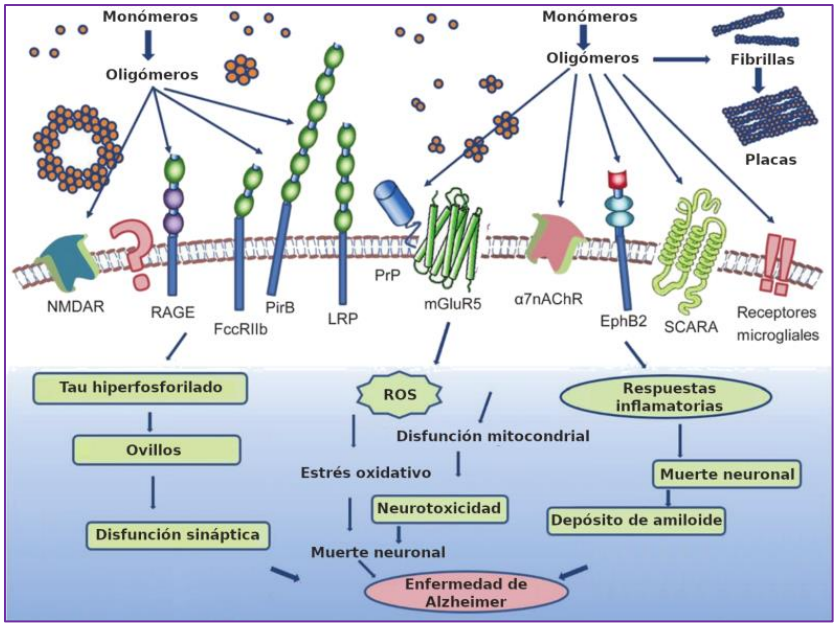


Figura 3. Ejemplos de mecanismos de toxicidad iniciados por agregados de Aβ. Los monómeros Aβ pueden formar agregados oligoméricos de bajo peso molecular, oligómeros de alto peso molecular, protofibrillas, fibrillas y placas seniles. El Aβ soluble puede interactuar con receptores potenciales y activar vías propias para generar especies reactivas de oxígeno, hiperfosforilar la proteína tau y causar respuestas inflamatorias, lo que puede fomentar la muerte neuronal. Adaptado de (G. F. Chen et al., 2017).

Sin embargo, la mayoría de los casos de la enfermedad no pueden explicarse por estas mutaciones, siendo la EA de inicio tardío idiopática, influenciada por otros factores genéticos y probablemente ambientales (Bettens et al., 2013; Reitz & Mayeux, 2014). En este sentido, además de las mutaciones genéticas directamente involucradas en el procesamiento de APP, se han identificado en base a estudios poblacionales docenas de factores de riesgo genéticos incluyendo APOE, CLU, PICALM, TREM2; ACE, ADAM10, etc. (Jansen et al., 2019; Kunkle et al., 2019; Prokopenko et al., 2021; Reitz & Mayeux, 2014). Muchos de estos genes se expresan predominantemente en células gliales y su actividad puede estar asociada con el metabolismo de APP, la respuesta inmune, la inflamación, el metabolismo de lípidos y el tráfico/endocitosis intracelular (Efthymiou & Goate, 2017; Reitz & Mayeux, 2014; Shi & Holtzman, 2018; Sims et al., 2017). El genotipo de APOE (apolipoproteína E) es un factor de riesgo bien conocido asociado con la EA de inicio tardío (Y. Huang & Mahley, 2014; Yamazaki et al., 2019). APOE es una glicoproteína de 34 kDa (299 aminoácidos) producida principalmente por los astrocitos en el cerebro y por el hígado en la periferia, con un importante rol en el metabolismo de los lípidos y en la eliminación de Aβ del líquido cefalorraquídeo (Y. Huang & Mahley, 2014; Yamazaki et al., 2019). En seres humanos se conocen tres alelos de APOE: APOE2, APOE3 y APOE4. E3 es la isoforma más común, E2 disminuye el riesgo de desarrollar la enfermedad y E4 lo aumenta. Esta predisposición es dependiente de la dosis del gen, que aumenta el riesgo al menos 3 veces más que el alelo E3 (Löwe et al., 2016).

Varios otros genes se destacan como factores de riesgo de la enfermedad. CLU (clusterina), también conocida como apolipoproteína J (ApoJ), es una lipoproteína y un chaperona involucrada en el metabolismo de los lípidos que también podría influir en la agregación y eliminación de Aβ extracelular (Nuutinen et al., 2009). PICALM (*phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein*) también participa en la endocitosis mediada por clatrina, reclutando a esta proteína y a AP-2 (*adaptor protein complex 2*) a los sitios de ensamblaje de vesículas (Tebar et al., 1999). TREM2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), es parte de una familia de glicoproteínas de superficie celular. Mejora la tasa de fagocitosis en microglia y macrófagos; modula la señalización inflamatoria; y regula la proliferación y supervivencia de las células mieloides (J. T. Li & Zhang, 2018; H. Zheng et al., 2018). En este sentido, el deterioro de TREM2 podría conducir a un aumento de la patología amiloide. ACE (*angiotensin-converting enzyme*) codifica una enzima involucrada en la conversión de angiotensina I en un péptido fisiológicamente activo, angiotensina II, un potente vasopresor. ACE también está involucrado en la degradación de Aβ (Jochemsen et al., 2014). La sobreexpresión de ACE en microglía y macrófagos en un modelo de ratones transgénicos de la EA (APPswe/PS1dE9) redujo sustancialmente el Aβ42 cerebral soluble, los depósitos de Aβ en el parenquima y la vasculatura, y la reactividad astrocitaria (Koronyo-Hamaoui et al., 2020). ADAM10 es la α-secretasa para APP que produce un fragmento de ectodominio secretado (sAPPα) con propiedades neuroprotectoras y neurotróficas. Corta además a la proteína Notch y varias proteínas de factores inmunitarios y de crecimiento (Manzine et al., 2019).

La acumulación de proteína tau es una característica destacada de múltiples enfermedades neurodegenerativas (Orr et al., 2017; Strang et al., 2019). La hipótesis tau contemporánea de la EA amplía el paradigma amiloide postulando una interacción molecular entre tau y los oligómeros Aβ en un círculo vicioso de neurotoxicidad (Nisbet et al., 2015). Por ejemplo, Aβ podría promover la hiperfosforilación de tau a través de la actividad de Cdk5 y GSK-3β (glucógeno sintasa quinasa 3 beta) (Esposito et al., 2013; J. Zhu et al., 2011). Las proteína tau hiperfosforilada se disocia entonces de los microtúbulos y acumula en el citosol, formando filamentos pareados helicoidales y rectos, que se ensamblan en ovillos (Falcon et al., 2018; Goedert, 2018). Los ovillos conducirían a la disfunción de los microtúbulos, ruptura del citoesqueleto, alteración del transporte axonal e inducción de la muerte neuronal. Asimismo, la agregación de tau disminuye la degradación de proteínas alterando el proteasoma e induciendo una respuesta inmune a través de la microglía y los astrocitos (Cyril Laurent et al., 2018).

1.2. Hipótesis complementarias y alternativas de la EA

Desde su concepción, la hipótesis de la cascada amiloide ha sido revisada con el fin de adaptarse a nuevas evidencias, por ejemplo respecto al rol de los oligómeros Aβ como agentes neurotóxicos (Cleary et al., 2004; Lacor et al., 2007). Recientemente, se han formulado varias críticas adicionales (Castellani et al., 2009; Hardy, 2009; Kepp, 2017; G. P. Morris et al., 2014; Reitz, 2012). El hecho principal es que una correlación directa entre las placas de amiloide y la pérdida sináptica y neuronal en el cerebro parece ser débil o ausente, siendo las alteraciones sinápticas o la patología tau un mejor indicador de la progresión de la enfermedad (Chételat, 2013; K. A. Johnson et al., 2013; Knopman et al., 2003; A. Masliah et al., 1991; Robakis, 2011; Terry et al., 1991; Villemagne et al., 2011). La patología amiloide

aumenta con la edad y se ha asociado con cierto grado de deterioro cognitivo, pero también puede estar presente en individuos catalogados como normales en niveles comparables a los de las personas enfermas (Bennett et al., 2006; Knopman et al., 2003; Rentz et al., 2010). Además, el depósito de amiloide comúnmente se estanca, independientemente del deterioro cognitivo (Engler et al., 2006; Ingelsson et al., 2004). Otro hallazgo interesante es que algunas mutaciones presentes en la EA relacionadas con la cascada amiloide no logran aumentar la producción de Aβ42 o la relación Aβ42/40 (Bentahir et al., 2006; Shioi et al., 2007). De manera similar, la neurodegeneración puede aparecer independientemente del depósito de placas (Jack et al., 2012). En particular, muchos modelos de ratones no muestran una pérdida neuronal sustancial, a pesar de la presencia de grandes depósitos de amiloide (LaFerla & Green, 2012). Además, el Aβ también se produce fisiológicamente en cerebros sanos durante la actividad neuronal y es necesario para la plasticidad sináptica y la memoria (Puzzo et al., 2015). En contraste con estos hechos, otros marcadores histopatológicos, como la pérdida sináptica, la α-sinucleína, los ovillos tau y la activación microglial, se correlacionan mejor con el curso de la enfermedad (Ingelsson et al., 2004; Knopman et al., 2003; M. E. Larson et al., 2012).

Considerando que los déficits cognitivos puedan derivar de alteraciones no amiloidogénicas, se han propuesto mecanismos alternativos y complementarios para explicar la fisiopatología de la enfermedad. Por ejemplo, la hipótesis colinérgica en la que se basan algunas terapias farmacológicas propone que la EA está causada por efecto de la reducción de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina (Shen, 2004). Otras evidencias apuntan a que la enfermedad es producto de un reingreso aberrante e infructuoso de las neuronas en el ciclo celular. Evidencia en este sentido es la presencia de marcadores del ciclo celular, replicación cromosómica (endo reduplicación), hipertrofia neuronal, alteraciones mitocondriales, fosforilación de tau y formación de ovillos, entro otros (Atwood & Bowen, 2015). El inicio no programado de un ciclo de división celular en una neurona madura, normalmente posmitótica, puede conducir a la contracción de sinapsis y neuritas y, en última instancia, a la muerte neuronal (Herrup et al., 2004; Raina et al., 2000; Wei Wang et al., 2009).

Sobre todo, se ha sugerido que la EA es principalmente un trastorno sináptico (Selkoe, 2002). La pérdida de sinapsis puede preceder y, de hecho, impulsar la pérdida de neuronas en una variedad de condiciones (Conforti et al., 2007). En particular, una mayor pérdida de sinapsis es evidente en el cerebro de pacientes con la enfermedad, la patología sináptica puede estar presente incluso antes de las placas y los ovillos neurofibrilares y está mejor correlacionada con la pérdida de memoria y el deterioro cognitivo observados en la enfermedad (Davies et al., 1987; DeKosky & Scheff, 1990; Dickson et al., 1995; E. Masliah et al., 2001; Sze et al., 1997; Terry et al., 1991). También se han realizado observaciones similares en algunos modelos murinos de la enfermedad (Crescenzi et al., 2017; J. Larson et al., 1999; William et al., 2012).

La hipótesis neuroinflamatoria de la EA sugiere que una activación aberrante de las células inmunitarias junto con disfunción vascular y estrés oxidativo pueden ocurrir primero y ser los principales impulsores de la muerte y disfunción neuronal en la enfermedad (Deane & Zlokovic, 2007; Ferreira et al., 2014; W. Sue T. Griffin, 2006; Sochocka et al., 2013). La inflamación está de hecho implicada en la etiología de la enfermedad. Una elevación de marcadores neuroinflamatorios está ampliamente reportada tanto en pacientes como en modelos animales (Flanders et al., 1995; W. S.T. Griffin et al., 1989; Heneka et al.,

2015; Lue et al., 1996; Luterman et al., 2000; K. Ma et al., 2011). Como se sugirió anteriormente, esto también se respalda en los estudios de factores de riesgo genético donde se han identificado polimorfismos en genes asociados a la inflamación (B. Zhang et al., 2013). Por ejemplo, varios de estos factores como TREM2 y la fosfolipasa Cγ2, se expresan en gran medida en la microglía, donde están involucrados en la función y activación celular (Sims et al., 2017). La microglía son las células inmunitarias residentes del cerebro y se cree que son las principales responsables de iniciar la respuesta inmunitaria a la patología de la enfermedad. Estudios imagenológicos *in vivo* indican que la activación de la microglía precede al inicio de la EA y va acompañada de un aumento de los niveles de marcadores inflamatorios en el líquido cefalorraquídeo (Brosseron et al., 2014; Hamelin et al., 2016). La lesión por trauma cerebral, las infecciones o el envejecimiento, son factores de riesgo para desarrollar la enfermedad, y podrían condicionar a la microglía y a otros tipos celulares para responder a un segundo estímulo de manera exagerada (hiperreactividad) (Mhatre et al., 2015; Norden et al., 2015; Witcher et al., 2015). Resultados *in vitro* indican que la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de la microglía puede provocar muerte neuronal directamente (Combs et al., 2001). En este sentido, los resultados de un modelo murino de EA indican que la inflamación sistémica afecta la eliminación microglial de Aβ (Tejera et al., 2019). Asimismo, ésta también podría promover la muerte neuronal actuando sobre los receptores tipo toll microgliales (Fiebich et al., 2018; Neniskyte et al., 2011).

Curiosamente, recientemente se propuso que Aβ, tau y otras proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas son, de hecho, miembros del sistema inmune innato (Bandea, 2013). Por ejemplo, los oligómeros podrían actuar como un agente antimicrobiano, según evidencias *in vivo* que muestran que la expresión de Aβ protege contra infecciones fúngicas y bacterianas en ratones, nematodos y modelos de cultivos celulares de EA (Soscia et al., 2010). En este marco, los cambios conformacionales de estas proteínas y su ensamblaje en varios oligómeros, placas y ovillos no serían eventos de plegamiento incorrecto, ni actividades de replicación de priones, sino parte de su repertorio inmunitario innato normal, seleccionado evolutivamente. La alteración de estas actividades conduciría a la neurodegeneración y otras enfermedades relacionadas.

Si bien la evidencia no es concluyente, algunos estudios epidemiológicos indican un posible vínculo entre el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y la reducción del riesgo de desarrollar la enfermedad (J. C. Breitner et al., 2011; J. C. S. Breitner & Zandi, 2009). Los resultados de estos estudios sugieren que los AINE no mejoran la patogenia de la enfermedad actuando directamente en el cerebro, sino sobre la inflamación sistémica, como aquella presente en la artritis reumatoide. Aunque los mecanismos de protección por los que los AINE actuarían siguen sin estar claros, las evidencias precedentes apoyan la hipótesis de que la inflamación en el cerebro y/o la periferia estaría implicada en la patogenia de la EA.

Es destacable que la EA se superpone con otras patologías como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), y las demencias con cuerpos de Lewy y vasculares, lo que sugiere la existencia de mecanismos fisiopatológicos comunes (De La Monte et al., 2006; Gil-Bea et al., 2010; Lucke-Wold et al., 2015; Niedowicz et al., 2014; Takeda et al., 2010). Asimismo, la obesidad, la DM2 y la ingesta crónica de dietas altas en grasas, especialmente grasas saturadas, se han relacionado con una función cognitiva reducida en adultos mayores (M. C. Morris et al., 2004; Prickett et al., 2015; R. H. X. Wong et al., 2014), siendo

todos ellos factores de riesgo para desarrollar demencia, incluida la EA (Beydoun et al., 2008; Kalmijn et al., 1997; Luchsinger et al., 2002; Vagelatos & Eslick, 2013). El metabolismo de la glucosa y la señalización por insulina se encuentran afectados en la EA (De La Monte et al., 2006; Gil-Bea et al., 2010). La resistencia a la insulina promueven un aumento de la expresión de Aβ (Son et al., 2012). Curiosamente, la enzima degradadora de insulina (IDE) también es responsable de la degradación de Aβ (Farris et al., 2003; Kurochkin & Goto, 1994; McDermott & Gibson, 1997; Vekrellis et al., 2000). En definitiva, esta relación bidireccional entre todos estos estados patológicos sugiere un mecanismo común que incluiría un aumento del estrés oxidativo, inflamación crónica y alteraciones metabólicas (alteración neuronal de la señalización de insulina, la reducción del metabolismo de la glucosa, etc.) (Cheignon et al., 2018; Haley et al., 2006; Heneka et al., 2015; L. Ferreira et al., 2012; Yan Zhao & Zhao, 2013). En base a estas asociaciones se están investigando la potencial aplicación de algunos tratamientos para la diabetes en la EA (ver sección *Tratamientos para la EA*).

1.3. Participación de los astrocitos en la EA

Los astrocitos son un tipo de célula glial presente a lo largo de todo el sistema nervioso central (SNC) formando un mosaico contiguo. Tienen una característica forma estrellada y generalmente se los asocia con la presencia de la proteína del filamento intermedio GFAP (figura 4). Participan de numerosas funciones esenciales (figura 5). Junto con las células endoteliales, las neuronas, los pericitos y otras celulas gliales constituyen la unidad neurovascular, responsable del correcto funcionamiento de la barrera hemato-encefálica (BHE) (Zlokovic, 2008). Tienen un rol fundamental en el mantenimiento de esta barrera (factores angiogénicos, etc.) y controlan finamente el medio circundante al regular el pH, la homeostasis de iones, el estrés oxidativo y el flujo sanguíneo (Sofroniew & Vinters, 2010; Verkhratsky & Nedergaard, 2017). La absorción de potasio, por ejemplo, es crucial para mantener el equilibrio en el entorno iónico extracelular. Este ion se distribuye a través del sincitio glial y, en momentos de liberación excesiva de potasio de las neuronas, puede eliminarse a través de los pies de los astrocitos a la circulación sanguínea.

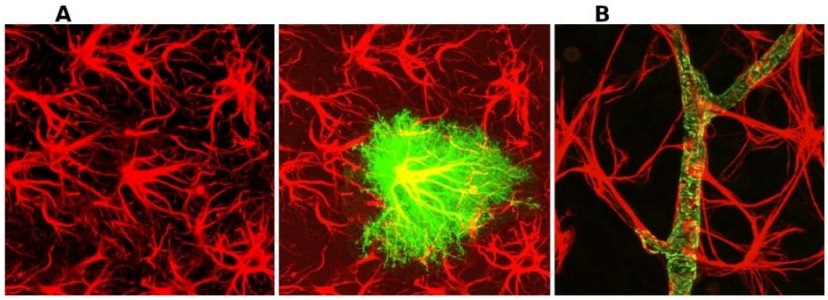


Figura 4. A. Reconstrucción tridimensional de un astrocito. Los astrocitos son visualizados con anticuerpos contra la proteína GFAP, la principal proteína de filamento intermedio (nanofilamento) de estas células. B. Astrocitos interactuando con los capilares sanguíneos. Los procesos de los astrocitos (visualizados con anticuerpos contra GFAP, rojo) establecen amplios contactos con los capilares en todo el SNC. Los pericitos, junto con las células endoteliales, los principales componentes estructurales de los capilares, se visualizan en B con anticuerpos contra la α-actina específica del músculo liso (ASMA) (verde). Adaptado de (Pekny & Pekna, 2014).

Estas células brindan apoyo trófico y metabólico a las neuronas y acoplan funcionalmente la actividad neuronal al flujo sanguíneo a través de respuestas de Ca^{2+} mediadas por glutamato (Perea et al., 2009; Zonta et al., 2002). Controlan la homeostasis de neurotransmisores glutamato y GABA. Estos aminoácidos se absorben a través de los transportadores de membrana GLT-1/EAAT2 y GAT3/4, respectivamente. Por ejemplo, el glutamato liberado por la transmisión sináptica es captado activamente por GLT-1 en los astrocitos, y reciclado de regreso a las neuronas en forma de glutamina (figura 5).

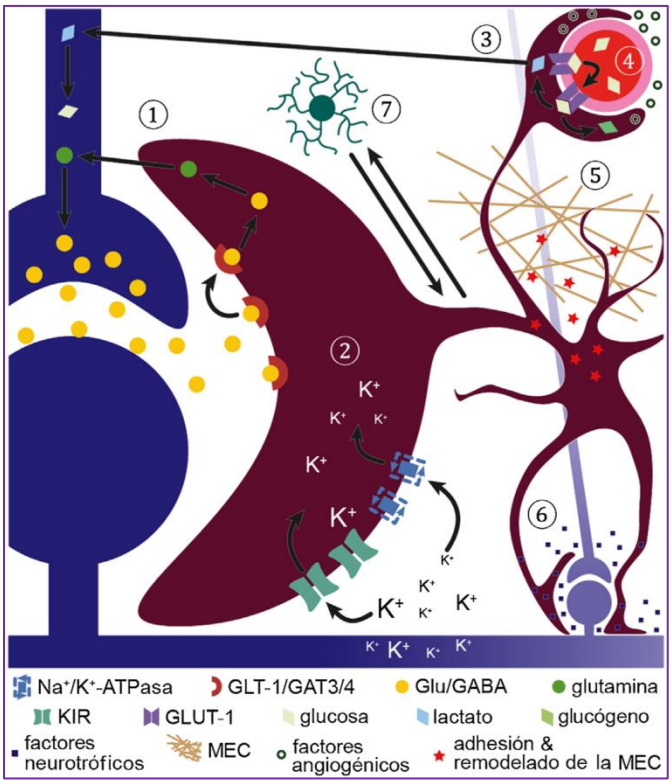


Figura 5. Ejemplo de funciones astrocitarias. Los astrocitos son esenciales para el mantenimiento y el funcionamiento del sistema nervioso dado su rol en la homeostasis de iones, neurotransmisores e intermediarios metabólicos, entre otros. Adaptado de (Osborn et al., 2016).

Asimismo, los astrocitos toman la glucosa de la sangre a través del transportador de glucosa GLUT-1, y esta se almacena en estas células en forma de glucógeno o se convierte en lactato. Se propone que en momentos de alta demanda de energía el lactato producido por los astrocitos puede suministrarse a las neuronas lo que se conoce como hipótesis del intercambio de lactato astrocito-neurona (figura 6). En este marco, la actividad neuronal conduce a la liberación del neurotransmisor glutamato en una sinapsis de este tipo. El glutamato es reciclado por los astrocitos lo que estimula tanto un aumento de la captación de glucosa de los capilares circundantes como de la glucólisis aeróbica. La glucólisis aeróbica también puede ser estimulada por la descomposición de las reservas intracelulares de glucógeno. El piruvato resultante se convierte en lactato mediante la enzima lactato deshidrogenasa (isoenzima A) (LDHA), se exporta fuera de la célula mediante el transportador de monocarboxilato 1 o 4 (MCT1/4) y se importa a las neuronas a través de MCT2. La enzima LDHB neuronal convierte el lactato en piruvato, que

se utiliza para impulsar la fosforilación oxidativa dentro de las mitocondrias. La glucosa también puede ingresar a las neuronas través de los transportadores GLUT-3. (Ver revisiones de (Bélanger et al., 2011; Bolaños, 2016; Hertz et al., 2007; Hertz & Rothman, 2017)).

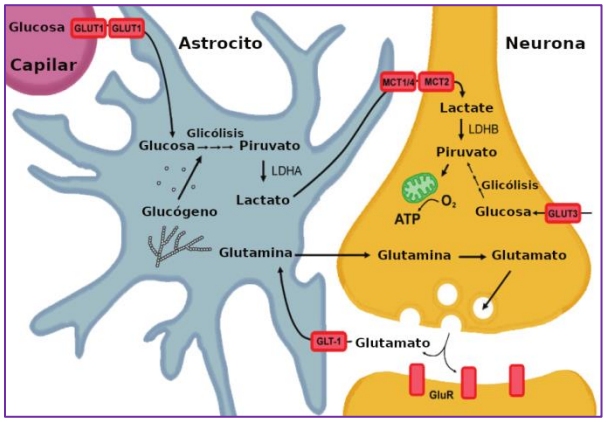


Figura 6. Detalle del ciclo de intercambio de lactato entre astrocitos y neuronas. Adaptado de (Newington et al., 2013).

Además, los astrocitos suministran a las neuronas precursores de la síntesis de glutatión y ayudan a protegerla contra el daño oxidativo (Sagara et al., 1993). Los células gliales normalmente muestran un nivel basal más alto de glutatión que las neuronas, y una mayor inducción de la expresión de glutatión en respuesta al estrés oxidativo, lo que sugiere que en condiciones normales son capaces de neutralizar cantidades más altas de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno (Iwata-Ichikawa et al., 1999; X. Sun et al., 2006).

Los astrocitos producen la mayoría de las proteínas de la matriz extracelular así como de sustancias que modifican esta matriz y moléculas de señalización tales como factores neurotróficos. De esta manera, por ejemplo, guían el crecimiento axonal y la sinaptogénesis de las neuritas (Baldwin & Eroglu, 2017; Rigby et al., 2020). Asimismo, modulan la transmisión de señales, la plasticidad neuronal y sináptica (Perea et al., 2009). Estas células también se comunican con la microglía, regulando e influyendo en las respuestas inmunes del cerebro.

Los astrocitos, al igual que la microglia, adquieren un fenotipo reactivo en respuesta al daño sobre el tejido nervioso (figura 7). Para ello desarrollan cambios importantes en su morfología y funcionamiento (Dossi et al., 2018; Sofroniew, 2020; Sofroniew & Vinters, 2010) (figura 8). La reactividad astroglial es una respuesta graduada, generalmente caracterizada por un aumento en las expresiones de GFAP, vimentina o proteína s100β y se ha detectado en tejidos post mortem de pacientes con la EA (figura 9) (Mrak & Griffin, 2005). En particular se ha evidenciado la presencia de astrocitos reactivos en torno a las placas de Aβ y ovillos tau (Itagaki et al., 1989; Serrano-Pozo et al., 2011). Sin embargo, un vínculo directo con los depósitos de amiloide no es concluyente según los estudios de correlación que utilizan el marcador GFAP (Serrano-Pozo et al., 2011; Simpson et al., 2010). Por el contrario, se puede encontrar una expresión similar de GFAP en cerebros obtenidos de pacientes cognitivamente sanos y dementes (Wharton et al., 2009).

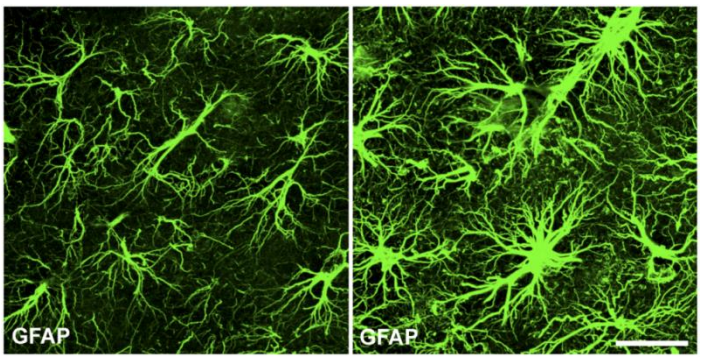


Figura 7. Astrocitos reactivos. En este ejemplo los astrocitos reactivos muestran hipertrofia de sus procesos celulares pero permanecen dentro de sus dominios en mosaico. Expresión de GFAP (verde) en astrocitos en hipocampo de ratón no estimulado (izquierda) y 4 días después de la lesión de la corteza entorrinal que desencadena la activación de astrocitos y gliosis reactiva en el hipocampo. Los procesos de los astrocitos reactivos muestran hipertrofia distintiva. Adaptado de (Pekny & Pekna, 2014).

Es importante resaltar que la astrogliosis en la EA nunca se asocia con la formación de cicatrices, o con la proliferación de astrocitos (Marlatt et al., 2014; Serrano-Pozo et al., 2013), aunque si se ha reportado la disrupción de astrocitos interlaminares en la corteza (Colombo et al., 2002). Asimismo, astrocitos derivados de células madre pluripotentes aisladas de pacientes con EA familiar y esporádica presentan rasgos de atrofia (Jones et al., 2017). Cambios similares se han detectado en astrocitos modelo derivados de pacientes con enfermedad de Parkinson (Ramos-Gonzalez et al., 2021). Dicha atrofia astrocitaria podría tener importantes consecuencias funcionales sobre la cobertura sináptica y el apoyo homeostático, así como el rendimiento funcional de la unidad neuronal-glial-vascular contribuyendo a los déficits cognitivos. Se han reportado en este sentido varias alteraciones en la EA y en modelos animales asociadas con la función sináptica y la unidad neurovascular que podrían asociarse con cambios en la función de los astrocitos (revisado en (Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018)).

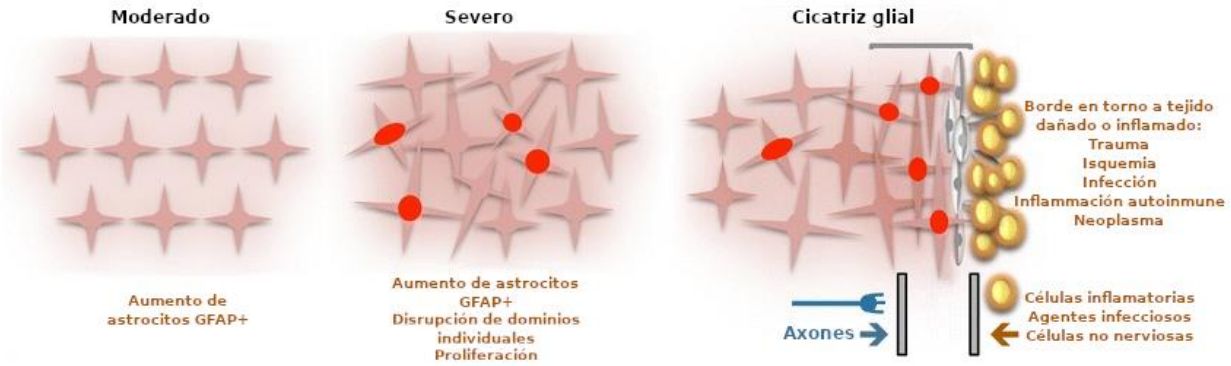


Figura 8. Representación esquemática de diferentes grados de reactividad glial. La reactividad glial puede presentarse como una respuesta graduada dependiendo de la severidad y duración del daño en el tejido nervioso. Adaptado de (Sofroniew & Vinters, 2010).

El grado de muerte de las células astrocíticas en la EA sigue sin estar claro, existiendo reportes contradictorios en la literatura. Estudios cuantitativos mediante identificación morfológica o

inmunohistoquímica con GFAP y ALDH1L1 o GS (glutamina sintasa) sugieren que el número neto de astrocitos corticales no varía en pacientes con la EA, lo que podría implicar un equilibrio entre muerte y proliferación (Pelvig et al., 2003; Serrano-Pozo et al., 2013). Se ha encontrado, evidencia de apoptosis aumentada en la corteza frontal y la región CA4 del hipocampo de tejido post mortem con menos del 13 % de células apoptóticas siendo astrocitos (W. P. Li et al., 1997). Otro estudio no encontró correlación entre las células apoptóticas y el grado de astrogliosis o acumulación de placa amiloide, lo que respalda el paradigma de pérdida neuronal generalizada en la patogénesis de la EA (Overmyer et al., 2000). Algunos estudios apuntan a marcadores apoptóticos presentes en astrocitos, particularmente en aquellos astrocitos que rodean placas seniles (Kobayashi et al., 2004; Smale et al., 1995). Astrocitos dañados rodeando las placas y en torno a los vasos sanguíneos en el tejido de pacientes con EA mostraron un aumento de fragmentos de GFAP escindidos con caspasa-3, lo que sugiere la estimulación de vías apoptóticas por Aβ (Mouser et al., 2006). También en tejido de pacientes con EA y en un modelo murino de EA, se evidenciaron astrocitos rodeando las placas Aβ que expresan PEA-15 (fosfoproteína enriquecida en astrocitos 15), una proteína que promueve la autofagia pero también tiene funciones reguladoras de la proliferación, metabolismo de glucosa, adhesión y migración (Thomason et al., 2013). En este caso, PEA-15 podría estar protegiendo a los astrocitos de la apoptosis durante estados inflamatorios (Kitsberg et al., 1999).

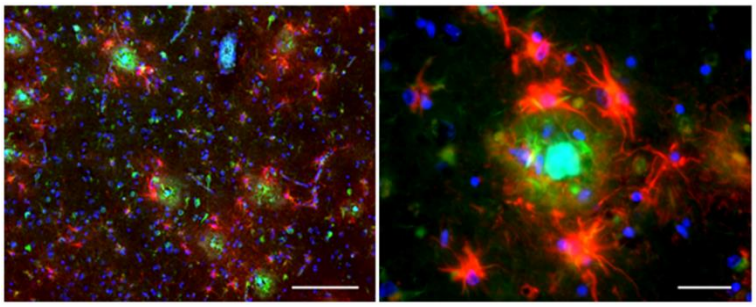


Figura 9. Astrocitos reactivos en torno a las placas amiloides en el cerebro con Alzheimer. Grupos de astrocitos inmunorreactivos para GFAP (rojo) que rodean las placas de amiloide de núcleo denso (positivo para tioflavina-S, verde) en la neocorteza de asociación temporal (área 38 de Brodmann) de un paciente con EA. Barras de escala: 100 µm en panel izquierdo, 10 µm en panel derecho. Adaptado de (Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018).

La reactividad astrocitaria es fundamentalmente una respuesta protectora, destinada a resolver estímulos nocivos. Varios estudios muestran efectos benéficos y neuroprotectores de los astrocitos reactivos en las neuronas circundantes. Los astrocitos reactivos actúan para limitar el daño, reparar la BHE, remodelar el tejido y proporcionar sustratos para el metabolismo energético cuando el suministro es bajo o se requieren sustratos alternativos (Buffo et al., 2010). Interrumpir el inicio de la astrogliosis ha resultado perjudicial en algunos casos. La atenuación de la astrogliosis mediante la interrupción de la vía STAT3, una de las principales vías de señalización asociadas, puede conducir en realidad a un aumento del estrés oxidativo (Sarafian et al., 2010). Sin embargo algunas evidencias sugieren efectos nocivos de astrocitos reactivos en la EA. En el contexto de esta enfermedad la reactividad astrocitaria puede desencadenarse por diversas moléculas, como Aβ, moléculas liberadas de células dañadas o ciertas citoquinas y quimioquinas. Por ejemplo, se encontró que el Aβ soluble induce *in vitro* astrogliosis y puede estar asociada con cambios en el calcio intracelular, agotamiento del glutatión y disfunción

mitocondrial (Abramov et al., 2003, 2004; Pike et al., 1994). Evidencias en un modelo murino de la EA sugieren que el cambio hacia un perfil más inflamatorio puede indicar la pérdida su funciones homeostáticas, lo que contribuiría a la degeneración de las células que dependen de estas funciones (Orre et al., 2014). Asimismo, estas evidencias remarcan el potencial terapéutico de estas células. La interrupción de la ruta de calcineurina/NFAT (nuclear factor of activated T cell), una vía de señalización inmunitaria, en astrocitos hipocampales de este mismo modelo redujo la astrogliosis y los niveles de Aβ, y mejoró el rendimiento cognitivo y la función sináptica (J. L. Furman et al., 2012).

Asimismo, la reactividad de los astrocitos en la EA podría estar asociada con alteraciones en la matriz extracelular (MEC). La MEC consta de proteoglucanos y glicoproteínas secretadas por la glía y las neuronas y determina por ejemplo la movilidad de los receptores AMPA en la hendidura sináptica (Frischknecht et al., 2009). Los astrocitos reactivos en torno las placas Aβ podrían alterar esta función a través de lisil oxidasa, una enzima que modula la MEC (Wilhelmus et al., 2013). También se ha observado en astrocitos que rodean las placas de Aβ una sobreexpresión de RGMa. Esta proteína interviene en el guiado axonal y podría actuar en este contexto como una señal protectora (marcando el área afectada como no apta para el crecimiento axonal) o contribuir directamente a la falla en la regeneración axonal (Satoh et al., 2013).

1.3.1. Interacción de astrocitos con el péptido amiloide y sus agregados

Según se mencionó previamente algunas evidencias indican que Aβ promueve la apoptosis de los astrocitos en la EA así como la reactividad glial (Abramov et al., 2003, 2004; Mouser et al., 2006; Pike et al., 1994). Asimismo, estudios *in vitro* sugieren que los astrocitos reactivos tienen un papel en la modulación de la neurotoxicidad mediada por Aβ (Paradisi et al., 2004). Resultados de otros estudios *in vitro* indican que el tratamiento de astrocitos cultivados con Aβ puede resultar en la inhibición de la absorción de glutamato, lo que podría conducir a efectos nocivos (Matos et al., 2008). El tratamiento con Aβ también puede agotar el glutatión tanto en las neuronas como en los astrocitos, dejando a las neuronas vulnerables al daño oxidativo (Abramov et al., 2003).

Usando el marcador GFAP, se han identificado astrocitos reactivos alrededor de los depósitos de placa amiloide en la enfermedad, si bien ciertas áreas pueden contener placas sin signos de gliosis (Kamphuis et al., 2014). Además, muestras de tejido post mortem de pacientes con EA muestran depósitos intracelulares de Aβ en los astrocitos que rodean las placas, así como la presencia de Aβ no fibrilar en gránulos similares a lisosomas (Funato et al., 1998; Kurt et al., 1999; Lasagna-Reeves & Kayed, 2011; Robert G. Nagele et al., 2003; Thal et al., 2000; Yamaguchi et al., 1998). Se piensa entonces que estas células contribuyen a la remoción y degradación de Aβ. Los estudios realizados en muestras humanas de la enfermedad sugieren que los astrocitos de la corteza entorrinal acumulan gradualmente Aβ42 y algunos sufren lisis celular, lo que resultaría en la formación de placas amiloides derivadas de astrocitos (Robert G. Nagele et al., 2003).

Estudios *in vitro* también sugieren un rol de los astrocitos en la degradación de Aβ (Pihlaja et al., 2008; Wyss-Coray et al., 2003). Los astrocitos son responsables de incorporar varias enzimas como la

neprilisina (NEP), la enzima convertidora de angiotensina (ACE), la enzima convertidora de endotelina (ECE), la enzima degradadora de insulina (IDE) y las metaloproteinasas de la matriz que degradan las plagas amiloideas (Mulder et al., 2012; Pihlaja et al., 2011; Wyss-Coray et al., 2003). *In vitro* captan preferentemente Aβ oligomérico (Nielsen et al., 2010). Astrocitos reactivos asociados a placas amiloides en un modelo murino de la EA expresan neprilisina, una peptidasa dependiente de zinc capaz de degradar Aβ (Apelt et al., 2003). Estudios en ratones APP/PS1 mostraron que la inhibición de la astrogliosis mediante la eliminación de la expresión de GFAP da como resultado un marcado aumento en la formación de placas amiloides, lo que respalda el papel de los astrocitos en la degradación de Aβ (Kraft et al., 2013).

La formación de placas de amiloide en pacientes con EA a menudo resulta de la falta de eliminación de Aβ42 y Aβ40 (Mawuenyega et al., 2010). Esto podría ocurrir por disminución de la actividad de APOE, predominantemente secretado por los astrocitos, así como un desbalance en la expresión de sus distintas isoformas (Buttini et al., 2010; Grehan et al., 2001; Koistinaho et al., 2004). Por otro lado, la contribución astroglial a la producción de Aβ no está completamente caracterizada. Si bien las neuronas han sido consideradas su principal fuente gracias a la expresión de las enzimas β- y γ-secretasas, la expresión de β-secretasa en astrocitos puede ser inducida por condiciones de estrés, agregando así otra fuente de amiloide (Blasko et al., 2000; Jin et al., 2012; Laird et al., 2005; Roßner et al., 2005; J. Zhao et al., 2011). Ejemplos de esto son los astrocitos que emergen tras una oclusión arterial o una lesión nerviosa, así como los astrocitos de modelos murinos de la EA (Hartlage-Rübsamen et al., 2003; Heneka et al., 2005; Roßner et al., 2005). En particular se ha observado en modelos murinos de la enfermedad, que TNF-α e IFN-γ pueden aumentar la producción de BACE1 en astrocitos (Hyun et al., 2007; Yamamoto et al., 2007; J. Zhao et al., 2011).

1.3.2. *EA y alteraciones metabólicas en astrocitos*

Una característica común de la EA es la deficiencia metabólica del cerebro. Estudios de imagenología funcional del cerebro indican una pérdida progresiva de la utilización de la glucosa en pacientes con diferentes etapas de la enfermedad, con déficits metabólicos ya presentes en las primeras etapas y un mayor deterioro en paralelo a su progresión (revisado en (S. Cunnane et al., 2011)) (Berent et al., 1999; Mosconi, De Santi, et al., 2008; Mosconi, Pupi, et al., 2008; Pagani et al., 2017; Protas et al., 2013; Rodriguez-Vieitez et al., 2016). GLUT-1 (Slc2a1) es el principal transportador de glucosa a través de la BHE desde la sangre hasta el cerebro, expresado por células endoteliales y en los pies terminales de los astrocitos (Koepsell & De, 2020). En este sentido la captación de glucosa en el cerebro se correlaciona con el nivel de GLUT-1 expresado en los capilares y parece estar disminuido en muestras post mortem de pacientes con la enfermedad (Horwood & Davies, 1994; Winkler et al., 2015; Zeller et al., 1997). En cuanto a la actividad de las enzimas del metabolismo de la glucosa la evidencia no es concluyente, existiendo estudios post mortem que muestran una disminución (Blass et al., 2000; Liang et al., 2008) o un aumento (Bigl et al., 1999) en el cerebro de pacientes. De manera similar, la evidencia *in vitro* de cultivos de astrocitos expuestos a Aβ indica un deterioro metabólico, aunque se han detectado tanto una disminución (Parpura-Gill et al., 1997) como un aumento (Allaman et al., 2010) del uso de glucosa. Por ejemplo, la exposición *in vitro* a Aβ aumenta el flujo de glucosa en astrocitos a través de glicolisis, la ruta de las pentosas fosfato y el ciclo del ácido cítrico, aumenta la producción de especies reactivas de

oxígeno, y reduce la viabilidad neuronal en cocultivo (Allaman et al., 2010). Astrocitos aislados de muestras humanas muestran una disrupción de la expresión de genes mitocondriales indicando también una alteración metabólica como consecuencia de la patología (S. Sekar et al., 2015). Se han observado déficits similares en el metabolismo energético en un modelo murino de la EA (Pedrós et al., 2014).

Alteraciones en los lípidos de la membrana están ampliamente descritas en cerebros de pacientes con EA y en varios trastornos neurodegenerativos (Sagin & Sozmen, 2008). Además, la producción y el metabolismo de lípidos y colesterol en el cerebro parece depender en gran medida de los astrocitos (J. A. Lee et al., 2021; Pfrieger & Ungerer, 2011). Se ha observado que los astrocitos aislados de ratones envejecidos tienen expresión génica reducida para una familia de genes relacionados con el metabolismo del colesterol (Boisvert et al., 2018). Los esfingolípidos como las esfingomielinas, las fosfatidilcolinas y los ácidos grasos insaturados, entre otros, se han asociado con la enfermedad (S. C. Cunnane et al., 2012; Snowden et al., 2017; Toledo et al., 2017; Varma et al., 2018; Wilkins & Trushina, 2018). Los niveles reducidos de fosfolípidos cerebrales, como las fosfatidilcolinas, también se han asociado (Whiley et al., 2014). El tratamiento de astrocitos con palmitato promueve la producción de Il-1β y la inducción de BACE1 en las neuronas (L. Liu, Martin, & Chan, 2013; L. Liu, Martin, Kohler, et al., 2013; L. Liu & Chan, 2014; Patil et al., 2006).

Se ha observado, tanto en el cerebro de pacientes y como en modelos murinos de la enfermedad, un aumento del nivel de colesterol así como de intermediarios de su biosíntesis (lanosterol, demosterol, 24-hidroxicolesterol, 27-hidroxicolesterol) (Y. Y. Cho et al., 2019; Heverin et al., 2004; Vanmierlo et al., 2010; Xiong et al., 2008). La ceramida es un metabolito del palmitato, un ácido graso abundante en las grasas saturadas de la dieta. Sus niveles también parecen aumentar en el tejido con EA y, posteriormente conducir a una mayor producción de Aβ (Cutler et al., 2004; Panchal et al., 2014; Patil et al., 2007). La evidencia *in vitro* sugiere que la acumulación de ceramida y colesterol en las neuronas aumenta su susceptibilidad a la muerte inducida por Aβ (Cutler et al., 2004). Además, Aβ podría actuar como una molécula de señalización informando a la red astroglial sobre la necesidad de colesterol de las neuronas, lo que establece un ciclo de retroalimentación entre ambas células (Canepa et al., 2011). Asimismo, la forma Aβ42 podría ejercer un efecto inhibitorio sobre la expresión del transportador de colesterol ABCA1 en astrocitos cultivados. ABCA1 tiene in rol importante en la modificación lipídica de ApoE (S. E. Wahrle et al., 2004); un proceso necesario para una mayor deposición de amiloide según se evidencia en un modelo murino de la enfermedad (S. E. Wahrle et al., 2008). Además, el procesamiento de APP y la generación de Aβ están influenciados por el colesterol, probablemente debido a la localización transmembranal del centro catalítico de la enzima γ-secretasa (Y. Y. Cho et al., 2019; Hur et al., 2008; Osenkowski et al., 2008; Vetrivel et al., 2004).

Además de los ejemplos anteriores, varios otros metabolitos, como la alanina, el aspartato y el glutamato, se han asociado con la EA, lo que ilustra varias alteraciones en el metabolismo energético y de los neurotransmisores influenciadas por la actividad de los astrocitos (Guiraud et al., 2017; Paglia et al., 2016).

1.3.3. EA y alteraciones de neurotransmisores en astrocitos

Glutamato es el principal transmisor presente en las sinapsis excitatorias de la corteza cerebral y el hipocampo, teniendo un rol importante en los procesos de aprendizaje y memoria. Sin embargo, también puede tener efectos neurotóxicos implicado en la patogenia de la EA (Hynd et al., 2004; Kirvell et al., 2006; Scott et al., 2011) y otros trastornos del sistema nervioso (Belov Kirdajova et al., 2020). En la sinapsis, la eliminación del exceso de glutamato, su conversión en glutamina y resíntesis a glutamato son algunas de las principales funciones astrocíticas. Los astrocitos mantienen la homeostasis del glutamato principalmente a través de la actividad de los transportadores GLAST (transportador de glutamato-aspartato), GLT-1 (transportador de glutamato 1, Eaat2/Slc1a2) y de la enzima GS. En este sentido, la astrogliosis también parece funcionar como un mecanismo protector contra la excitotoxicidad (Lizhen Li et al., 2008).

En pacientes con EA se encontró una expresión reducida de GS y GLT-1 sugiriendo una alteración de esta homeostasis (Jacob et al., 2007; G. Le Prince et al., 1995). Curiosamente, variantes de *splicing* de GLT-1 en la enfermedad también pueden explicar una reducción de la eficiencia de absorción de glutamato observada (Scott et al., 2011). Evidencia *in vitro* indica que la exposición de astrocitos a Aβ42 reduce la expresión superficial de GLT-1 (Scimemi et al., 2013). En un modelo murino de patología tau en estas células también se ha observado una alteración de la homeostasis del glutamato (Dabir et al., 2006). La evidencia de otras patologías sugiere que la disfunción sináptica está asociada con la regulación negativa de GLT-1 en los astrocitos y viceversa (Campbell et al., 2014; Y. Yang et al., 2009). La expresión de GLT-1 en estas células está influenciada en parte por las vías de señalización de la insulina en el cerebro. El tratamiento con insulina aumenta la expresión proteica de GLT-1 en astrocitos *in vitro* (Y. F. Ji et al., 2011). Las vías de señalización de la insulina están alteradas en la EA con una distribución anormal de los receptores de insulina en las neuronas (Moloney et al., 2010), y la resistencia a la insulina parece ser una característica común del deterioro cognitivo temprano de los pacientes (Talbot et al., 2012). En el mismo sentido, la pérdida de la expresión de GLT-1 puede conducir posteriormente a anomalías en la señalización de la insulina, de acuerdo a evidencia en un modelo murino de la enfermedad (Meeker et al., 2015).

El GABA (ácido gamma-aminobutírico) es el principal neurotransmisor presente en las sinapsis inhibitorias por lo que generalmente regula la excitabilidad neuronal en todo el sistema nervioso (Tillakaratne et al., 1995). Los receptores GABA incluyen dos clases de GABA-A y GABA-B. El contenido de GABA, así como los receptores GABA-A, parecen estar reducidos en ciertas regiones del cerebro de los pacientes con EA (Chu et al., 1987; Mizukami et al., 1998; Rissman et al., 2007; Seidl et al., 2001). Asimismo, la actividad de una de las enzimas del metabolismo de GABA, GABA-T (GABA transaminasa), se puede encontrar reducida en las cortezas frontal, parietal, occipital y temporal y el núcleo caudado de pacientes con la enfermedad (Sherif et al., 1992). Se ha propuesto que la inflamación en la base del cerebro frontal presente en la EA facilita la liberación de GABA a través de la producción de óxido nítrico (Casamenti et al., 1999).

Los astrocitos contribuyen a la transmisión GABAérgica mediante el suministro de glutamina, necesaria para la biosíntesis de GABA en las terminales neuronales y eliminando parte del GABA liberado a través

de los transportadores GAT-1 y GAT-3 (Schousboe et al., 2017). Después de ser transportado a los astrocitos, la mayor parte del GABA es catabolizado por GABA-T a succinato, que posteriormente se utiliza para la producción de ATP (Walls et al., 2014). Debido a este catabolismo energético, la concentración de GABA en el citosol en estas células es baja. No obstante, estudios del cerebelo de modelos murinos sanos sugieren que los astrocitos también pueden liberar GABA de manera tónica (Ishibashi et al., 2019; Soojung Lee et al., 2010; Ormel et al., 2020).

Alteraciones en la transmisión por GABA han sido implicadas en la EA (Y. Li et al., 2016). En particular, distintas evidencias de modelos murinos sugieren un aumento en la expresión de GABA y su transportador en astrocitos reactivos (Aldabbagh et al., 2021, 2022; Brawek et al., 2018; Jo et al., 2014; Z. Wu et al., 2014). Cambios en el contenido de GABA de estos astrocitos se acompañan de una inducción de la enzima de paso limitante en la síntesis de GABA, glutamato descarboxilasa (GAD-67), así como de un aumento en la expresión de monoaminoxidasa-B (MAO-B), específica de astroglia (Jo et al., 2014; Z. Wu et al., 2014). La actividad de glutamato descarboxilasa, también se encontró aumentada en sinaptosomas aislados de áreas con acumulación de placa de amiloide en pacientes con EA y en un modelo murino de la misma (Mitew et al., 2013). La alteración de GABA en los astrocitos podría ser una respuesta compensatoria para amortiguar la hiperexcitabilidad neuronal presente en las primeras etapas la enfermedad, así como en torno a las placas amiloides (Busche & Konnerth, 2015; Ovsepian et al., 2019). Al respecto también se ha observado una mayor expresión de transportadores y receptores de glutamato en astrocitos de un modelo murino (Peters et al., 2009). Eventualmente, el aumento en la producción de GABA podría tener un efecto perjudicial produciendo un desequilibrio hacia la inhibición. En este sentido, la desregulación de GABA en astrocitos reactivos de modelos animales de la EA se ha asociado con un deterioro de la memoria (Jo et al., 2014; Z. Wu et al., 2014).

1.4. Senescencia celular en la EA

El envejecimiento involucra varios procesos que ocurren de manera conectada, destacandose la senescencia celular (López-Otín et al., 2013; McHugh & Gil, 2018). Esta se caracteriza por una detención permanente del ciclo celular y resistencia a la apoptosis mediante la actividad de p16ink4a y p53-p21-Rb (retinoblastoma) (Kritsilis et al., 2018; X. Zhu et al., 2021).

La senescencia celular está asociada con cambios en el metabolismo celular, incluyendo un cambio de la fosforilación oxidativa a la glucólisis, la regulación positiva del ciclo del ácido tricarboxílico, la vía de las pentosas fosfato y las vías de síntesis de nucleótidos, así como la regulación negativa de la síntesis de ácidos grasos y la función mitocondrial alterada (Correia-Melo et al., 2016; Kritsilis et al., 2018; B. Y. Lee et al., 2006; Weichhart, 2018; M. Wu et al., 2017). Algunos marcadores metabólicos típicos son la regulación positiva de la β-galactosidasa lisosomal, y la acumulación de lipofuscina en el citoplasma (Georgakopoulou et al., 2012; B. Y. Lee et al., 2006).

Estímulos como la disfunción mitocondrial, cambios epigenéticos, el desgaste de los telómeros, el daño persistente del ADN y la exposición a patrones de daño (DAMP) pueden iniciar la senescencia celular (Campisi & D'Adda Di Fagagna, 2007). Las células senescentes se acumulan con el envejecimiento y secretan moléculas proinflamatorias y degradantes de la matriz como parte de un heterogéneo fenotipo

secretor (SASP, *senescence-associated secretory phenotype*) (Birch & Gil, 2020; Lopes-Paciencia et al., 2019; S. G. Rao & Jackson, 2016). Algunos de los factores comúnmente asociados a la SASP incluyen citoquinas (IL-1α, IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-8, CXCL1, CCL4, CCL6), factores de crecimiento (TGF-β, Fgf2, Hgf), metaloproteinasas (MMP1 -colagenasa intersticial-, MMP3 - estromelisina 1-, MMP13 - colagenasa 3-), así como otras proteínas insolubles y componentes de la matriz extracelular (Basisty, Kale, Jeon, et al., 2020; Fafián-Labora & O'Loghlen, 2020; Hernandez-Segura et al., 2017). Sus efectos son principalmente parácrinos, pero pueden volverse sistémicos ya que algunos de los mediadores solubles pueden pasar a la circulación. Los reguladores destacados de SASP incluyen p38MAPK, NF-κB y mTOR.

El SASP es beneficioso para la remodelación de tejidos y la cicatrización de heridas (Lopes-Paciencia et al., 2019). Sin embargo, a medida que las células senescentes se acumulan con la edad y la patología, el SASP contribuye no solo a la inflamación temporal local, sino también a la inflamación sistémica crónica (Ferrucci & Fabbri, 2018; P. Song et al., 2020). Esta inflamación se asocia al desarrollo de varias enfermedades relacionadas con la edad, incluidas las enfermedades neurodegenerativas (D. Furman et al., 2019).

La capacidad de sobrevida de las células senescentes depende de la activación de vías antiapoptóticas incluyendo BCL-2/BCL-XL, PI3K/AKT, p53/p21/serpinas, receptores de tirosina quinasas, HIF-1α, etc. (James L. Kirkland & Tchkonia, 2017; Soto-Gamez et al., 2019). Estas cascadas están asociadas a respuestas a proteínas desplegadas lo que puede ser particularmente importante para las proteinopatías. En este sentido las células senescentes muestran un aumento de respuestas asociadas a estrés de retículo (*unfolded protein response*) (Cormenier et al., 2018).

Si bien se la ha caracterizado como una respuesta al estrés contra el cáncer, estudios recientes destacan su papel degenerativo en la EA y las tauopatías (Carreno et al., 2021; Musi et al., 2018; Saez-Atienzar & Masliah, 2020; Walton et al., 2020). En ese sentido, la senescencia celular puede contribuir a la correlación inversa observada entre el riesgo de desarrollar neurodegeneración y cáncer. Las células que pasan por la senescencia pueden evadir una ruta cancerígena, pero impulsar la neurodegeneración en la edad adulta. Esta relación, sin embargo, se ve complicada por una multitud de factores que se han identificado para aumentar al mismo tiempo el riesgo de neurodegeneración, senescencia y cáncer. La senescencia en sí también puede aumentar la incidencia de cáncer a través del SASP (Carreno et al., 2021).

Se han descrito neuronas con rasgos senescentes en cerebros humanos y de roedores envejecido, lo que sugiere la activación de un mecanismo similar en células posmitóticas (Acklin et al., 2020; Jurk et al., 2012; Kritsilis et al., 2018; Moreno-Blas et al., 2019). Esto se ha descripto como "amitosenescencia" e implica un intento de las células posmitóticas de volver a inducir el ciclo celular (McHugh & Gil, 2018; Wengerodt et al., 2019). La senescencia celular puede explicar varios atributos observados en la EA tal como la acumulación de proteína tau (Musi et al., 2018). Existe evidencia de senescencia de astrocitos en pacientes con la enfermedad (Bhat et al., 2012). Modelos de neurodegeneración en ratones y cultivos celulares indican que la glía senescente y, en particular, los astrocitos senescentes pueden promover la patología (Bhat et al., 2012; Bussian et al., 2018; Chinta et al., 2018). Asimismo, la

eliminación de células senescentes en modelos de ratones previene el deterioro cognitivo característico de los mismos (Bussian et al., 2018; P. Zhang et al., 2019).

Los marcadores senescentes p16INK4a (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) y MMP1 se han encontrado sobre-expresados en astrocitos de la EA (Bhat et al., 2012). En este mismo estudio, la exposición *in vitro* de estas células a Aβ42 también desencadenó la senescencia y estuvo acompañada por una regulación positiva de p38, IL-6 e IL-8. En otro estudio *in vitro*, tras la senescencia replicativa o inducida por estrés, los astrocitos se aplanaron y agrandaron con cambios en la cromatina y niveles elevados de p53, p21, p16 y SA-β-gal (Bitto et al., 2010). Se destaca que los astrocitos envejecidos *in vitro* tenían una capacidad reducida para mantener la supervivencia neuronal (Pertusa et al., 2007).

2. Antecedentes particulares

2.1. Astrocitos con fenotipo neurotóxico asociados a enfermedades neurodegenerativas

El rol de diferentes poblaciones de astrocitos reactivos en la fisiología y patología del SNC ha sido propuesto por varios autores (M. A. Anderson et al., 2014; Y. Zhang & Barres, 2010). En este contexto se han descrito en los últimos años varios tipos particulares de astrocitos reactivos, generalmente con un fenotipo neurotóxico. Por ejemplo, se ha estudiado el perfil de astrocitos reactivos purificados de ratones tratados con una inyección sistémica de LPS (agonista de receptores TLR4) o mediante la oclusión de la arteria cerebral media. De este modo se generó un estado de inflamación sistémica o isquemia cerebral que indujeron dos tipos diferentes de astrocitos reactivos, denominados "A1" y "A2", respectivamente (Zamanian et al., 2012). Un análisis del transcriptoma de estas células evidenció que el subtipo A1 regula al alza muchos genes, tales como algunos factores de la cascada del complemento, que pueden contribuir a la degeneración sinápica (Hong et al., 2016; A. Sekar et al., 2016; Stevens et al., 2007; Zamanian et al., 2012). Sobre todo, el medio condicionado de estos astrocitos es capaz de inducir la apoptosis de ciertas neuronas y oligodendrocitos, pero no de otros tipos de células del sistema nervioso. *In vitro* estos astrocitos evidenciaron una pérdida de funciones importantes incluyendo una capacidad reducida para inducir la formación y función de sinapsis, pérdida de capacidad para fagocitar sinapsis y pérdida de capacidad para promover la supervivencia y el crecimiento neuronal (Liddelow et al., 2017).

Utilizando el marcador C3 u otros asociados se ha sugerido que los astrocitos A1 están presentes en otros modelos, así como en regiones del cerebro involucradas en la neurodegeneración de una variedad de enfermedades humanas, incluida la EA (Balu et al., 2019; Hartmann et al., 2019; Joshi et al., 2019; Liddelow et al., 2017; Ugalde et al., 2020; Yun et al., 2018). Asimismo, un estudio de transcriptoma de ratones envejecidos sugiere que astrocitos con un perfil de marcadores A1 aumentan con la edad (Clarke et al., 2018).

Astrocitos reactivos neurotóxicos de tipo A1 podrían ser inducidos por activación de la ruta de NF-κB (Lian et al., 2015; Liddelow et al., 2017). Evidencias en modelos de cultivo mixto indican la aparición de un fenotipo de astrocito C3+ neurotóxico estimulado por microglia a través de la activación en esta de la ruta TLR4-NF-κB (Villarreal et al., 2021). En el mismo sentido, evidencias *in vitro* e *in vivo* en un modelo de ratón indica que la microglia puede promover la generación de astrocitos con un perfil A1 a través de la liberación de al menos tres citocinas: interleucina 1 alfa (IL-1α), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y la subunidad del componente del complemento 1q (C1q) (Clarke et al., 2018; Liddelow et al., 2017). Se destaca también que el promotor del factor C3 inducido en astrocitos A1 tiene sitios de unión putativos de NF-κB lo que contribuiría a establecer dicho fenotipo (Lian et al., 2015). Además, el C3 astrocítico liberado al espacio extracelular puede enviar señales a las neuronas y la microglía, mediando la muerte y la activación celular, respectivamente (Lian et al., 2015, 2016). La propagación del daño ejercido por estos tipos celulares podría deberse también a la liberación de mitocondrias microgliales fragmentadas y disfuncionales en el medio neuronal (Joshi et al., 2019). La fragmentación excesiva y disfunción mitocondrial en las neuronas es un evento conocido de las enfermedades

neurodegenerativas, incluidas la EA, la ELA, la EP, la demencia, la ataxia y la encefalopatía inducida por hipertensión (Itoh et al., 2013; Joshi et al., 2018; Reddy, 2014). Cabe destacar que la eliminación de los factores IL-1α, TNF-α, and C1q asociados con la inducción de astrocitos de A1 extendió la sobrevida del modelo SOD1G93A de ELA (Guttenplan et al., 2020). Sin embargo la eliminación de astrocitos C3+ resultó perjudicial en un modelo de infección priónica, indicando que sus efectos son contexto-dependientes (Hartmann et al., 2019).

A diferencia de los astrocitos A1, los astrocitos A2 regulan al alza muchos factores neurotróficos, que promueven la supervivencia y el crecimiento de las neuronas, así como las trombospondinas, que promueven la reparación de sinapsis. En este sentido, estudios previos han evidenciado que los astrocitos reactivos inducidos por isquemia promueven la recuperación y reparación del SNC (Gao et al., 2005; Hayakawa et al., 2014; Manley et al., 2009; Sofroniew & Vinters, 2010). Se estima estos astrocitos también se corresponderían a los astrocitos reactivos inducidos por Stat3 en modelos de trauma agudo que favorecen la regeneración neuronal (M. A. Anderson et al., 2016).

La posible contribución de astrocitos con fenotipo neurotóxico se ha evidenciado también en la ELA. Se ha descrito por ejemplo que astrocitos cultivados del ratón mutante Sod1G93A liberan un factor que puede matar a las motoneuronas (Di Giorgio et al., 2007, 2008; Lobsiger et al., 2007; Marchetto et al., 2008; Nagai et al., 2007; Vargas et al., 2006). En particular se destaca el aislamiento de astrocitos con fenotipo aberrante (denominados "células AbA", *aberrant astrocytes*) en cultivos primarios de médula espinal de ratas sintomáticas que expresan la mutación SOD1G93A (Díaz-Amarilla et al., 2011). Este aislamiento se basó en la marcada capacidad proliferativa de las células AbA y la falta de senescencia replicativa. En este sentido se observó que las AbAs proliferan más rápido que los astrocitos neonatales o adultos, pudiendo replicarse más de 20 veces (Díaz-Amarilla et al., 2011; Ibarburu et al., 2017) y presentando una ausencia permanente de inhibición por contacto (Jiménez-Riani et al., 2017). De manera semejante a los astrocitos A1, las células AbA resultaron toxicas para las motoneuronas al secretar factores solubles aún no conocidos o debido además a la pérdida de funciones homeostáticas tales como la falta de expresión de transportadores de glutamato (GLT-1) (M. M. Das & Svendsen, 2015; Díaz-Amarilla et al., 2011).

Las células AbA expresan marcadores de astrocitos indiferenciados, incluyendo niveles elevados de S100β y conexina 43, baja expresión de GFAP (Díaz-Amarilla et al., 2011), ausencia de gliofilamentos y abundancia de microtúbulos (Jiménez-Riani et al., 2017). Expresan asimismo vimentina y glutamina sintasa, carecen como se mencionó anteriormente de GLT-1 e inicialmente del marcador NG2 (Díaz-Amarilla et al., 2011). Las AbAs presentarían alteraciones importantes en la comunicación celular, la autofagia y la proteostasis, así como estrés del ER, disfunción del metabolismo lipídico, disfunción mitocondrial y preponderancia del metabolismo glucolítico como fuente de energía resultando semejante a células cancerígenas (Ibarburu et al., 2017; Jiménez-Riani et al., 2017; Martínez-Palma et al., 2019). Astrocitos con un perfil tipo AbA (S100β+, conexina 43+, NG2-) se identificaron en torno a motoneuronas cercanas, y su número aumentó considerablemente después del inicio de la enfermedad en el modelo transgénico (Díaz-Amarilla et al., 2011). Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que las AbAs derivarían de precursores microgliales (Trias et al., 2013). Aunque la expresión de SOD1 mutante restringida a los astrocitos no es suficiente para inducir la degeneración de motoneuronas en ratones

transgénicos (Tg) (Y. H. Gong et al., 2000), la escisión genética de SOD1 mutante en astrocitos prolongó la supervivencia y disminuyó la activación de la microglía, sin efecto sobre el inicio la enfermedad (Yamanaka et al., 2008).

Astrocitos similares a las AbAs también se han aislado de la corteza del modelo mSOD (Gomes et al., 2019, 2020). Asimismo, la toxicidad de los astrocitos no se limitaría a modelos animales que expresan SOD1 mutante. Astrocitos humanos derivados de la médula espinal de personas con ELA esporádica y familiar también pueden matar motoneuronas en cultivo (Haidet-Phillips et al., 2011). Más recientemente se derivaron a partir de fibroblastos de pacientes con ELA esporádica o hereditaria astrocitos con un efecto nocivo sobre las neuronas *in vitro* (Gomes et al., 2022; Varcianna et al., 2019).

Utilizando la estrategia de secuenciación masiva de núcleos aislados (*single-nucleus RNA-Seq*) se identificaron en el modelo murino transgénico 5xFAD de la EA un tipo de astrocito asociado el desarrollo de la patología (DAAs, *disease associated astrocytes*) (Habib et al., 2020). Estas células tienen una expresión elevada de GFAP, aparecieron en las primeras etapas de la enfermedad y aumentaron en abundancia con su progresión, encontrándose en corteza e hipocampo. La aparición de DAAs estuvo acompañada por una disminución significativa en relación con los ratones salvajes de la población de astrocitos homeostáticos (GFAP bajo). Astrocitos similares fueron observados en ratones de tipo salvaje envejecidos y en cerebros humanos envejecidos (Clarke et al., 2018). Los DAAs expresaron un conjunto único de genes, incluidos genes involucrados en la endocitosis, la cascada del complemento y el envejecimiento. Entre los genes regulados al alza se encontraban Serpina3n que codifica un inhibidor de serina-proteasa asociado con una mayor acumulación de amiloide (Mucke et al., 2000), y Ctsb (Cathepsin B), que codifica una cisteína proteasa lisosomal involucrada en el procesamiento de APP (C. Wang et al., 2012). Curiosamente, los DAAs así como un grupo de células con un fenotipo intermedio también expresaron Apoe y Clu, junto con otros genes que codifican proteínas asociadas con el metabolismo y la eliminación de amiloide (Roussotte et al., 2014). Posiblemente esta población de astrocitos se corresponda con los astrocitos aislados previamente por Iram y colaboradores (Iram et al., 2016). Dichos astrocitos presentaron una expresión aumentada de GFAP con respecto a los obtenidos de animales no transgénicos, así como una capacidad disminuida para procesar Aβ42, regulación al alza de Il6 (transcripto), menor soporte neuronal y promoción de la muerte neuronal frente a un insulto oxidativo. Curiosamente esa limitación pudo revertirse con la adición exógena del factor del complemento C1q, encontrado a su vez en mayor cantidad en torno a las placas de amiloide en este modelo.

Se han aislado también los llamados astrocitos derivados de isquemia (*ischemia-derived astrocytes*, IDAs), provenientes de la penumbra y el núcleo isquémico temprano de rata (Villarreal et al., 2016). Los IDAs no se originarían a partir de precursores mieloides, sino a partir de progenitores locales preexistentes. Difieren notablemente de los astrocitos primarios, ya que proliferan *in vitro* con una alta tasa de división celular, muestran una mayor capacidad migratoria, tienen una senescencia replicativa reducida y crecen en presencia de macrófagos dentro de los límites impuestos por la cicatriz glial. Estos astrocitos producen un medio condicionado capaz de inducir la activación de astrocitos primarios inactivos y potenciar la muerte neuronal frente a la privación de oxígeno y glucosa. Al ser reimplantados

en cerebros normales de rata los mismos fomentarían la reactividad glial tras migrar del sitio de inyección.

Además de factores del complemento otras proteínas se han propuestas como posibles mediadoras de los efectos neurotóxicos de astrocitos reactivos. La proteína Lcn2 pertenece a la familia de las lipocalinas, caracterizada por su capacidad de unirse y transportar lípidos y otras moléculas hidrofóbicas (Devarajan, 2007). Presenta efectos proapoptóticos en cultivo frente a neuronas y otros tipos celulares (Kehrer, 2010). Curiosamente, Lcn2 se secreta a partir de astrocitos cultivados tras la estimulación con lipopolisacáridos y puede servir como mediador autócrino estimulando a los astrocitos y la microglía circundantes para que se vuelvan reactivos (Shinrye Lee et al., 2009; Zamanian et al., 2012). En el modelo mutante TDP-43 de rata se identificó a dicha proteína como un potente mediador de neurotoxicidad, secretado posiblemente por astrocitos reactivos (Bi et al., 2013). Estudios recientes han demostrado que Lcn2 aumenta en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA (Naudé et al., 2012), y su concentración también es indicativa de la progresión de la enfermedad en modelos de neurodegeneración en ratas. Serina racemasa (SR), la enzima neuronal que produce el coagonista D-serina del receptor NMDAR, se expresa astrocitos reactivos C3+ en el hipocampo y la corteza entorrinal de individuos con EA así como en un modelo de EA en rata (Balu et al., 2019). Esta expresión se observó asociada a cambios de señalización intracelular consistentes con una mayor activación de NMDAR extrasináptico, excitotoxicidad y disminución de la supervivencia neuronal. Estudios *in vitro* (Suyan Li et al., 2018) y en un modelo de ratón de lesión cerebral traumática (Perez et al., 2017) también evidencian que los astrocitos reactivos expresan serina racemasa. Se destaca que la anulación condicional de esta enzima solo de los astrocitos GFAP+ protege a los ratones de los efectos dañinos de la lesión sobre la función sináptica en el hipocampo (Perez et al., 2017). Recientemente también se ha evidenciado que la expresión de lípidos saturados contenidos en lipopartículas de Apoe y Apoj puede mediar la toxicidad inducida por astrocitos (Guttenplan et al., 2021).

2.2. Modelo murino triple transgénico de la EA (3xTg-AD)

Los ratones triple transgénicos de la EA (3xTg-AD) fueron creados combinando mutantes de los tres principales genes implicados en la enfermedad: APPSwe (APP), PS1M146V (presenilina) y TauP301L (tau) (figura 10) (Oddo, Caccamo, Kitazawa, et al., 2003; Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003). En lugar de cruzar tres líneas transgénicas, se microinyectaron dos transgenes independientes que codifican APPSwe humano y tauP301L humano (ambos bajo el control del elemento regulador Thy1.2 de ratón) en embriones unicelulares recolectados de ratones mutantes homocigóticos PS1M146V knockin (PS1-KI). Como resultado se observó que las regiones relevantes para la EA, incluidos el hipocampo y la corteza cerebral, se encontraban entre las que contenían los niveles basales más altos tanto de la APP humana como de la proteína tau.

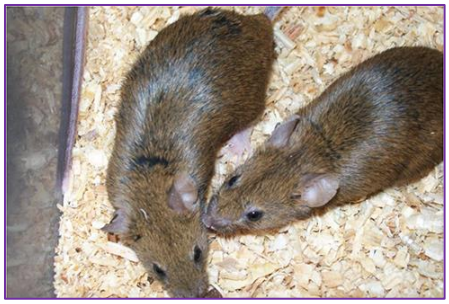


Figura 10. Modelo murino triple transgénico de la EA (3xTg-AD). Adaptado de (Orta-Salazar et al., 2016).

Estos ratones mostraron un patrón temporal y regional específicos de patología amiloide y tau, que se asemeja a la observada en el cerebro humano con EA (figura 11) (Javonillo et al., 2022; Oddo, Caccamo, Kitazawa, et al., 2003; Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003). Asimismo muestra déficits cognitivos dependientes de la edad, astrogliosis y atrofia cerebral que sugieren pérdida sináptica y neuronal (Billings et al., 2005; Chiquita et al., 2019; Oddo, Caccamo, Kitazawa, et al., 2003). En particular, mostraron una potenciación reducida a largo plazo en el hipocampo junto con deterioros funcionales y cognitivos, en particular memoria espacial y a largo plazo deficientes. Además, bajo microscopía electrónica se observaron alteraciones de la vaina de mielina y deterioro de la morfología axonal en ratones de 2 a 6 meses de edad, posiblemente debido a una pérdida de oligodendrocitos (Desai et al., 2009, 2010).

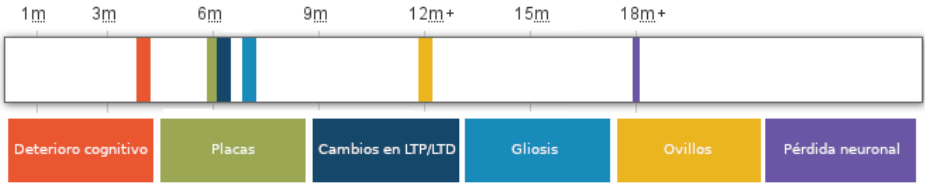


Figura 11. Progresión de la patología en el modelo 3xTg-AD. Adaptado de www.alzforum.org/.

Estos cambios patológicos progresan de manera relacionada con la edad, destacándose que los déficits funcionales preceden a la aparición de las características histológicas. Aunque los depósitos extracelulares de Aβ en la corteza son aparentes a los 6 meses de edad (e incluso antes para la inmunorreactividad intracelular de Aβ), no se observan alteraciones de tau en esa etapa. No es hasta aproximadamente los 12 meses de edad que la inmunorreactividad de la proteína tau humana es evidente en las neuronas de la región CA1, especialmente en los compartimentos somatodendríticos. Por lo tanto, a pesar de la sobreexpresión comparable de estas dos proteínas mutantes, la patología Aβ se desarrolla mucho antes que la patología tau. Si bien la patología de Aβ y tau se inicia en diferentes regiones del cerebro de los ratones (corteza para Aβ e hipocampo para tau), no es incompatible con la noción de que Aβ influye en la patología de tau. Por ejemplo, la inmunorreactividad de tau y Aβ se pueden observar en las mismas neuronas. En este modelo los déficits cognitivos se correlacionan con la acumulación de Aβ intraneuronal (Carroll et al., 2007; McKee et al., 2008).

De manera similar a los seres humanos, la homeostasis de glutamato se encuentra comprometida en ratones 3xTg-AD dado que se observa una disminución de la enzima GS, aunque la misma no esté

necesariamente asociada con una reducción en la expresión de GLT-1 (Kulijewicz-Nawrot et al., 2013; Olabarria et al., 2011). La reducción de GS en la corteza frontal se puede observar a partir de los 6 meses de edad y en el giro dentado a partir de los 12 meses, precediendo a la pérdida dendrítica observada a partir de los 15 meses en la corteza frontal y el hipocampo (Bittner et al., 2010; Kulijewicz-Nawrot et al., 2013; Olabarria et al., 2011). Al mismo tiempo, la expresión de la glutamina sintetasa se regula específicamente a la baja en los astrocitos reactivos que rodean las placas Aβ en el hipocampo y la corteza prefrontal de estos ratones (Olabarria et al., 2011). También se pueden observar disminuciones asociadas a la edad en glutamato, GABA y esfingolípidos (Y. Dong & Brewer, 2019). El Aβ parece no detectarse en astrocitos de ratones 3xTg-AD (Olabarria et al., 2010). El tráfico de vesículas subcelulares parece estar atenuado en astrocitos 3xTg-AD (Stenovec et al., 2016).

Durante la progresión de la patología de la enfermedad en ratones 3xTg-AD, los astrocitos experimentan cambios morfológicos importantes. Alrededor de un mes de edad, antes de la aparición evidente de placas amiloides los astrocitos en la corteza entorrinal muestran signos de atrofia morfológica (C. Y. Yeh et al., 2011). La atrofia astroglial se desarrolla luego en la corteza prefrontal (3–4 meses de edad) y finalmente en el hipocampo (6–9 meses de edad), sin mostrar una relación correlativa con la acumulación de placa (Kulijewicz-Nawrot et al., 2012; Olabarria et al., 2010, 2011; C. Y. Yeh et al., 2011). Cambios atróficos muy similares se observaron en los astrocitos del hipocampo de otro modelo animal de EA, los ratones APP mutantes (PDAPP-J20) (Beauquis et al., 2013). El número total de astrocitos (marcados con anticuerpos contra GFAP, s100β o GS) no mostró variaciones con la edad en ratones 3xTg-AD de 3 a 24 meses de edad (Olabarria et al., 2010, 2011). La atrofia generalizada de estas células sugiere entonces cambios de la forma en que interactúan con las neuronas circundantes y sus sinapsis (Kulijewicz-Nawrot et al., 2012; C. Y. Yeh et al., 2011). Algunos estudios *in vitro* también sugieren la pérdida de su funciones homeostáticas por parte de ciertas poblaciones de astrocitos. Por un lado, astrocitos inmortalizados aislados del hipocampo de ratones 3xTg-AD neonatales tienen una capacidad disminuida para mantener la integridad de la barrera hematoencefálica a través de mecanismos paracrinos (Kriaučiūnaitė et al., 2021). Asimismo, astrocitos aislados de ratones 3xTg-AD neonatales mostraron *in vitro* un tráfico de vesículas deteriorado (Stenovec et al., 2016).

En el hipocampo de ratones 3xTg-AD se ha evidenciado la aparición de reactividad astrocitaria en la últimas etapas de la patología (12 a 18 meses), cuando también comienzan a desarrollarse ovillos neurofibrilares en las neuronas. La evidencia en este modelo sugiere que los oligómeros de Aβ pueden alterar la homeostasis del Ca^{2+} del retículo endoplásmico (ER, *endoplasmic reticulum*) y, a su vez, inducir respuestas de estrés en el organelo lo que puede conducir a la astrogliosis (Alberdi et al., 2013). Numerosos astrocitos hipertróficos se acumulan alrededor de placas amiloides y en torno de vasos sanguíneos inundados de Aβ (Olabarria et al., 2010). Esta hipertrofia astroglial se caracteriza por un aumento de volumen y superficie tanto de los somas como de los procesos de los astrocitos, que pueden aumentar su tamaño hasta en un 70 %. Al mismo tiempo, los astrocitos alejados de las placas seniles conservan su morfología atrófica. A diferencia del hipocampo, la acumulación de Aβ y la formación de placas no inducen la reactividad de los astrocitos ni en la corteza entorrinal ni en la prefrontal (Kulijewicz-Nawrot et al., 2012; C. Y. Yeh et al., 2011).

Tal como se comentará más adelante, evidencias recientes sugieren que ciertas poblaciones de astrocitos en el modelo 3xTg-AD pueden adquirir funciones nocivas durante la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, se evidenció que las vesículas extracelulares liberadas *in vitro* por astrocitos de ratones 3xTg-AD de 8-9 meses de edad pueden dañar las células de la unidad neurovascular (González-Molina et al., 2021).

2.2.1. Astrocitos neurotóxicos aislados del modelo 3xTg-AD sintomático

Recientemente el Dr. Pablo Diaz y col. en el grupo I+D Biomédico del CUDIM aislaron y cultivaron astrocitos de corteza e hipocampo de ratones adultos 3xTg-AD sintomáticos de 9-10 meses de edad (Diaz-Amarilla et al., 2022), un periodo en el que puede observarse reactividad glial (Kreimerman et al., 2019; Oddo, Caccamo, Kitazawa, et al., 2003). Estos astrocitos "envejecidos" (Tg.Old o Tg.Viejos) presentaron una alta tasa de proliferación y una diferencia pronunciada del nivel y patrón de expresión de varios marcadores astrocitarios, GFAP, S100β y Conexina 43 (Cx43) en comparación con astrocitos control aislados de ratones neonatales transgénicos y no transgénicos. El aislamiento de esta población de astrocitos proliferantes con baja expresión de GFAP contrasta con otros hallazgos que muestran que no habría cambios en el número de este tipo de células dados por el envejecimiento o la progresión de la enfermedad, aunque esta evidencia se basa en astrocitos GFAP+ (Olabarria et al., 2010). Alteraciones similares de los marcadores GFAP, S100β y Cx43 se han observado en otros contextos y modelos, así como en muestras humanas de la EA (Angeli et al., 2020; Cirillo et al., 2015; Díaz-Amarilla et al., 2011; Kajiwara et al., 2018; Kamphuis et al., 2014; Marshak et al., 1992; Tatsumi et al., 2018; Yasuda et al., 2004; C. W. Yeh et al., 2015). Se destaca que la actividad de S100β puede estar asociada a efectos proinflamatorios, proapoptóticos o sobre la cascada amiloide y tau, entre otros (Cristóvaõ & Gomes, 2019; Leclerc et al., 2010). Asimismo, la proteína Cx43 participa en la formación de hemicanales, entre otras actividades puede estar asociada a la plasticidad de las sinapsis glutamatérgicas y su alteración también se ha visto en la EA (Chever et al., 2014; Dermietzel et al., 1989; Giaume & Theis, 2010; R. P. Huang et al., 1998; Kajiwara et al., 2018; D. Zhu et al., 1992). Su disfunción puede asociase a una disminución de la capacidad neuroprotectora de los astrocitos o incluso a neurotoxicidad (Almad et al., 2022; Kielian & Esen, 2004; Rouach et al., 2002; C. Yi et al., 2016). Además de estas aletaraciones se observa una tendencia a la sobreexpresión de MAO-B, lo que podría promover una mayor síntesis del neurotransmisor GABA.

Principalmente, se destaca que los astrocitos Tg.Old resultaron ser neurotóxicos para cultivos primarios neuronales tanto en cocultivo neurona-astrocito como tras añadir su medio acondicionado (MCA). En comparación con el tratamiento con medio condicionado de astrocitos 3xTg-AD neonatales, el tratamiento de cultivos primarios neuronales con MCA produjo cambios en el estado de fosforilación de GSK-3β hacia su forma activa —fosforilada en el residuo tirosina 216 (Y216) —, así como un aumento de la actividad de caspasa-3 y un cambio en el patrón de expresión del citocromo c. Estas evidencias sugieren que la exposición a este medio condicionado desencadena el inicio de la vía apoptótica intrínseca en las neuronas primarias (Beurel & Jope, 2006). Aunque aún no se conoce el agente neurotóxico, este efecto no sería debido a la presencia de Aβ en el medio ya que el bloqueo de su

generación por tratamiento con DAPT (*N-[N-(3, 5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-s-phenylglycinet-butyl ester*) no previene la muerte neuronal.

Curiosamente, la exposición de las neuronas a este medio condicionado provocó distintas respuestas dependiendo del domino subcelular tratado. Utilizando cámaras microfluídicas compartimentadas, se observó que el tratamiento con MCA en el dominio somato-dendrítico causó tanto localmente la degeneración de este dominio como distalmente la de los axones. Sin embargo, la exposición aislada de los axones no afectó la integridad somato-dendrítica mientras que del lado axonal resultó ser trófica. Estos resultados sugieren la liberación tanto de factores neurotróficos como de moléculas neurotóxicas con acción somática. Asímismo, un mismo agente podría tener efectos opuestos dependiendo de la ubicación subcelular de su blanco molecular. Este puede ser el caso de neurotrofinas/pro-neurotrofinas tales como el factor de crecimiento neuronal (Ngf) cuya liberación por los astrocitos se ha propuesto tiene un papel en la progresión de la EA (Sáez et al., 2006).

La población de astrocitos neurotóxicos Tg.Old solo se identificó cuando se aisló de ratones adultos 3xTg-AD sintomáticos pero no de neonatos 3xTg-AD en una fase pre-sintomática de la enfermedad o de ratones no transgénicos. Esto sugiere que su aparición está ligada a la progresión de la patologia en el modelo, en concordancia con evidencias previas de otros modelos animales de ELA y EA (Díaz-Amarilla et al., 2011; Gomes et al., 2020; Iram et al., 2016). Su aparición no reflejaría simplemente la presencia de los transgenes asociados a la EA. En cambio, el medio neuroinflamatorio que evoluciona durante la progresión de la patología en estos animales prodria ser el promotor de la transición fenotípica de sus precursores correspondientes.

Estos resultados de caracterización de los astrocitos Tg.Old fueron integrados a la pulicación de (Diaz-Amarilla et al., 2022) que se encuentra adjunta en el Anexo 1.1 de la tesis.

En resumen, el proceso neurodegenerativo crónico observado en la EA se caracteriza por una fuerte reactividad astrocitaria que se establece precozmente y permanece activa durante toda la fase sintomática. La proliferación de astrocitos con un perfil inflamatorio en las áreas cerebrales afectadas sugiere que estas células podrían estar involucradas en la disfunción neuronal primaria, la respuesta neuroinflamatoria subyacente y la posterior muerte neuronal a través de varios mecanismos propuestos (figura 12). En este mismo sentido, se han descrito diferentes tipos de astrocitos con características comunes en diversos modelos de neurodegeneración, entre los que destacan su alta capacidad proliferativa y su efecto neurotóxico asociado a la producción de factores en su medio condicionado. Los astrocitos Tg.Old presentan características similares, apoyando la hipótesis de que este tipo de células tendrían un papel patogénico relevante en la progresión de la enfermedad.

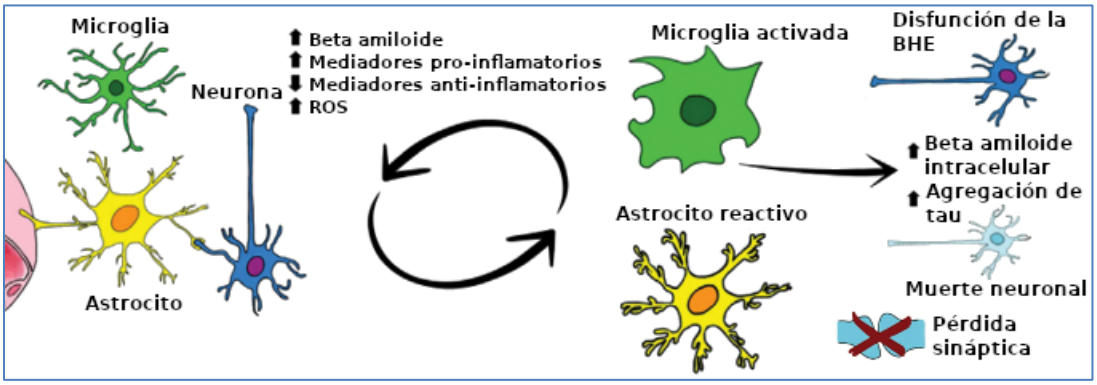


Figura 12. Hipótesis de la fisiopatología de la EA considerando el rol de astrocitos y microglia. Adaptado de (Bronzuoli et al., 2016).

II. HIPÓTESIS

En base a la evidencia presentada, en esta tesis planteamos la hipótesis de que la población de astrocitos neurotóxicos aislados de ratones 3xTg-AD sintomáticos tendría un papel patogénico relevante en la progresión de la enfermedad. En particular, su caracterización a nivel metabólico y molecular podría contribuir al conocimiento del proceso fisiopatológico subyacente, así como al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Este proyecto pretende contribuir al conocimiento de los cambios celulares y moleculares presentes en el microambiente que rodea el proceso degenerativo de la EA, y en especial del potencial papel patogénico de los astrocitos en esta enfermedad. En particular, nos centramos en el estudio de astrocitos neurotóxicos aislados de ratones 3xTg-AD sintomáticos como potencial blanco terapéutico celular mediante un enfoque metabolómico y transcriptómico.

1.1. Objetivos específicos

1- Evaluar la expresión génica de astrocitos neurotóxicos derivados de ratones 3xTgAD sintomáticos -(astrocitos "viejos", Tg.Old) mediante una estrategia de *RNA-Seq* tomando como referencia ratones 3xTg-AD no sintomáticos (neonatales, Tg.Neo) y ratones no transgénicos (neonatales, Wt.Neo). Identificar transcriptos diferencialmente expresados, evaluar alteraciones potencialmente asociadas al fenotipo neurotóxico de los astrocitos Tg.Old así como puntos de regulación con potencial de tratamiento farmacológico.

2- Implementar una estrategia de metabolómica no dirigida para evaluar el fenótipo metabólico de astrocitos neurotóxicos Tg.Old tomando como referencia astrocitos Tg.Neo y Wt.Neo. Identificar metabolitos diferencialmente expresados, metabolitos con posible efecto neurotóxico y posibles asociaciones entre las alteraciones metabólicas y transcripcionales.

3- Evaluar estrategias farmacológicas para revertir el fenotipo neurotóxico de los astrocitos Tg.Old y prevenir la muerte neuronal en modelos de cultivo primario. En particular, evaluar la capacidad neuroprotectora de flavonas preniladas en cultivos primarios neuronales tratados con MCA de astrocitos Tg.Old así como su efecto sobre los cultivos astrocitarios neurotóxicos.

En base a los objetivos propuestos, presentamos en los capítulos IV, V y VI los fundamentos teóricos particulares y la estrategia experimental seleccionada para cumplir cada uno, seguido de los resultados obtenidos y su respectiva discusión.

IV. CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA

En este capítulo nos centramos en la caracterización transcriptómica de los astrocitos Tg.Old. Este enfoque nos permite dilucidar varias preguntas como: ¿Qué genes se expresan diferencialmente? ¿Qué tipo de astrocito son estas células? ¿Qué alteraciones funcionales pueden estar implicadas en su fenotipo neurotóxico? ¿Cuál puede ser el origen de los astrocitos Tg.Old?

A continuación, detallamos los fundamentos de esta herramienta ómica, seguido de una breve reseña de la estrategia experimental utilizada, y finalmente la presentación y discusión de los resultados obtenidos. Estos forman parte de un artículo aceptado para su publicación en el *Journal of Molecular Neuroscience*, y agregado adjunto en el Apéndice 1 de esta tesis. En ese material pueden encontrarse mayores detalles de metodología, resultados y ejemplos asociados.

1. Fundamentos de transcriptómica

La transcriptómica es el estudio global de todo los ARN transcriptos o transcriptoma de un organismo. Gran parte de la información contenida en un organismo se registra en el ADN de su genoma y se expresa a través de la transcripción. Los transcriptos pueden funcionar como moléculas intermediarias para funciones codificantes como los ARNm (1-4 %), o realizar funciones no codificantes adicionales (~95 %) como los ARN ribosomales, de transferencia, nuclear pequeño, de interferencia pequeña (*small*), micro y no codificantes largos. La transcriptómica se ha convertido en una extensa disciplina gracias a varias innovaciones tecnológicas de las últimas décadas, en particular los enfoques de microarreglos (*microarrays*) y la secuenciación masiva *RNA-Seq* (Nelson, 2001; Z. Wang et al., 2009). Los *microarrays* miden la abundancia de un conjunto definido de transcriptos a través de su hibridación con un conjunto de sondas complementarias, lo que requiere cierto conocimiento previo del organismo de interés, por ejemplo, en forma de un secuencia genómica anotada. *RNA-seq* surgió más recientemente y actualmente es la alternativa más común, con numerosas aplicaciones en análisis transcriptómicos (Geng Chen et al., 2012). *RNA-seq* se refiere a una técnica de secuenciación de los transcriptos en forma de ADNc (copia en ADN del ARN), que permite una cobertura casi completa de un transcriptoma dado y donde la abundancia se deriva del número de lecturas generadas para cada transcripto. Las secuencias de nucleótidos generadas suelen tener una longitud de alrededor de 100 pb, pero pueden oscilar entre 30 pb y más de 10 000 pb, según el método de secuenciación utilizado. La reconstrucción de la transcripción de ARN original se realiza alineando las lecturas con un genoma de referencia o entre sí (ensamblaje de novo) (Conesa et al., 2016; Z. Wang et al., 2009). Esta estrategia ofrece varias ventajas, como un mayor rango dinámico y un menor ruido (M. S. Rao et al., 2019), y la capacidad de detectar y cuantificar la expresión de genes y transcripciones previamente desconocidos, incluidas nuevas isoformas (Trapnell et al., 2010), empalmes alternativos (AS) (Sultan et al., 2008), ARN no codificantes (Cabili et al., 2011), modificaciones postranscripcionales (M. Li et al., 2011; X. Wang et al., 2008), y polimorfismos de un solo nucleótido (E. Y. Kang et al., 2016). Además, *RNA-Seq* es compatible con cantidades bajas de ARN, lo que permitió el desarrollo de estudios con células individuales (*single cell RNA-Seq*) (Geng Chen et al., 2019).

1.1. Adquisición de datos

El flujo de trabajo típico para generar datos crudos de transcriptoma, incluye los siguientes pasos: (i) purificar el ARN de interés con alta calidad; (ii) convertir el ARN en ADN complementario (ADNc); (iii) marcar químicamente e hibridar el cDNA con sondas en chip (*microarray*) o fragmentar el cDNA y construir una biblioteca para secuenciar por síntesis (*RNA-Seq*); (iv) ejecutar el microarray o secuencia a través de la plataforma de elección; y (v) realizar un control de calidad ad hoc (Conesa et al., 2016; Kukurba & Montgomery, 2015) (figura 13). La selección apropiada de estos pasos es parte de un buen diseño experimental. Por ejemplo, para *RNA-Seq*, la sensibilidad y la precisión dependen de la cantidad de lecturas obtenidas de cada muestra. Se necesita una gran cantidad de lecturas para garantizar una cobertura suficiente del transcriptoma, y que permita la detección de transcriptos de baja abundancia. El rendimiento de la secuenciación depende del tamaño del transcriptoma de un organismo; por ejemplo, un transcriptoma humano podría capturarse con precisión utilizando *RNA-Seq* con 30 millones de lecturas de 100 pb por muestra (Conesa et al., 2016). Además, la detección de expresión diferencial en genes de baja expresión se mejora agregando más réplicas biológicas.

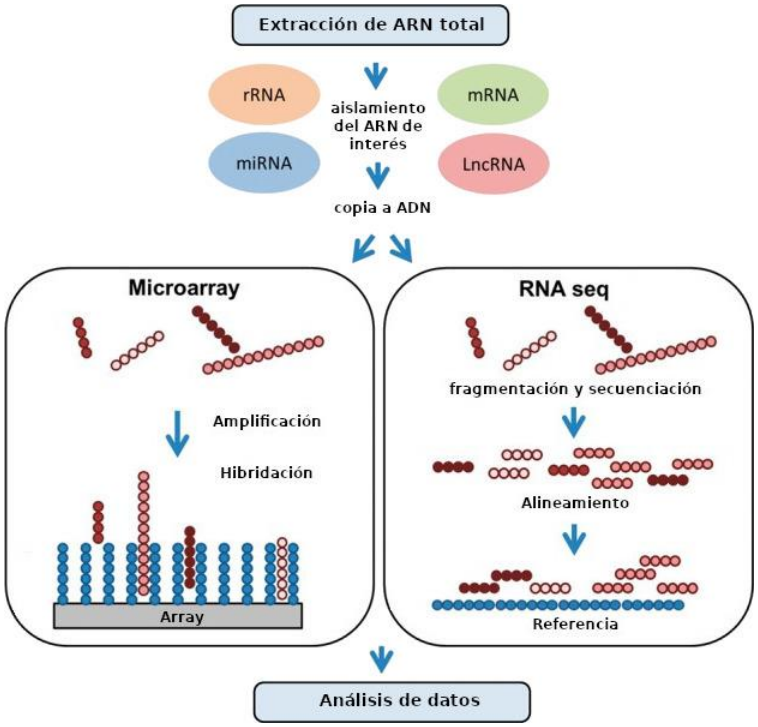


Figura 13. Esquema del proceso de generación de datos en estudios de transcriptómica. Adaptado de (Manzoni et al., 2018).

El aislamiento de ARN del organismo experimental es entonces un requisito previo de todos los estudios de transcriptómica. Las técnicas de extracción de ARN son muy similares e implican lo siguiente: ruptura mecánica de células o tejidos, disrupción de RNasas con sales caotrópicas, ruptura de macromoléculas y complejos de nucleótidos, separación de ARN de biomoléculas no deseadas, incluido el ADN, y concentración del ARN a través de la precipitación de la solución o mediante elución en una matriz sólida (Chomczynski & Sacchi, 2006). El ARN aislado puede tratarse adicionalmente con ADNasa para

digerir cualquier rastro de ADN. Los estudios de transcriptómica comunes se centran en el ARNm, que debe enriquecerse en las muestras, ya que los extractos de ARN total suelen tener más del 90 % de ARN ribosómico. Este enriquecimiento se puede realizarse mediante métodos de afinidad poli-A o mediante la remoción del ARN ribosomal utilizando sondas específicas de secuencia (Bryant & Manning, 1998; W. Zhao et al., 2014). Los ARN pequeños, como los microARN, se pueden purificar en función de su tamaño mediante electroforesis en gel seguida de extracción. Una vez que se extrae el ARN, se puede continuar con la construcción de la biblioteca, que incluye pasos para la fragmentación del ARN, copia a ADNc y amplificación. Al final de la preparación de la biblioteca de *RNA-Seq*, cada secuencia se compone de un inserto de cDNA con un tamaño determinado flanqueado por secuencias adaptadoras, según se requiera para la amplificación y secuenciación en una plataforma específica.

Dado que *RNA-Seq* se basa en la copia de moléculas de RNA en moléculas de cDNA antes de la secuenciación, las plataformas de secuenciación son las mismas tanto para obtener datos transcriptómicos y como genómicos (ej. Illumina). La secuenciación directa de ARN mediante la secuenciación de nanoporos representa una técnica emergente de *RNA-Seq*. Esta incorpora algunas ventajas, como ausencia de pasos de amplificación que puedan introducir sesgos, o la posibilidad de detectar bases modificadas que, de lo contrario, quedarían enmascaradas al secuenciar el ADNc (Ozsolak et al., 2009).

Una vez preparados, los transcriptos se pueden secuenciar en una sola dirección (*single-end*, extremo único) o en ambas direcciones (*paired-end*, extremo emparejado). Una secuenciación *single-end* suele ser más rápida de producir, menos costosa que la secuenciación *paired-end* y suficiente para la cuantificación de los niveles de expresión génica. La secuenciación *paired-end* produce alineamientos o ensamblajes más robustos, lo que es beneficioso para la anotación de genes y el descubrimiento de isoformas de transcripción. Los métodos *RNA-Seq* específicos de una cadena conservan la información de cadena de una transcripción secuenciada (*stranded-RNA-Seq*) (Levin et al., 2010). Sin información de cadena, las lecturas se pueden alinear con un locus de gen, pero no informan en qué dirección se transcribe el gen. *Stranded-RNA-Seq* es útil para descifrar la transcripción de genes que se superponen en diferentes direcciones y para hacer predicciones génicas más sólidas en organismos no modelo.

1.2. Preprocesamiento de datos

Los experimentos de *RNA-Seq* generan un gran volumen de datos que requiere una combinación de herramientas informáticas para analizar. El proceso incluye varios pasos, como control de calidad, alineación, cuantificación y análisis de expresión diferencial.

1.2.1. Control de calidad

Muchos errores técnicos pueden estar presentes en un experimento de secuenciación. Por ejemplo, las lecturas de secuencia no son perfectas, por lo que cada base secuenciada tiene una precisión asociada a un puntaje. Los datos crudos se examinan entonces en busca de puntajes de alta calidad para las bases secuenciadas, para detectar si el contenido de guanina-citosina coincide con la distribución esperada, y si existe un sobrerepresentación de motivos de secuencia particularmente cortos (*k-mers*) o una tasa de duplicación de lectura inesperadamente alta (Conesa et al., 2016). La precisión de cada base

secuenciada, medida por el puntaje de calidad de *Phred* (puntuación Q), es la métrica más común para evaluar la precisión de una plataforma de secuenciación. Indica la probabilidad de que el secuenciador identifique incorrectamente a una base determinada. Existen varias opciones para el análisis de la calidad de la secuencia, incluidos los paquetes de software *FastQC*, *FaQCs* y *NGSQC* (Andrews, 2010; M. Dai et al., 2010; Lo & Chain, 2014). Como regla general, la calidad de lectura disminuye hacia el extremo 3' de las lecturas y, si es demasiado baja, se deben eliminar las bases para mejorar el alineamiento a una referencia (*mapeabilidad*). Existen varias herramientas de software como *FASTX-Toolkit* y *Trimmomatic* (Bolger et al., 2014; Hannon, 2010) que permiten descartar o recortar lecturas de baja calidad y secuencias de adaptadores.

1.2.2. Alineamiento

Para asociar la abundancia de lecturas con la expresión de un gen en particular, las secuencias de transcripción se alinean con un genoma de referencia, o por ejemplo, si esto no es posible se alinean *de novo* entre sí. La alineación de transcriptos primarios de ARNm derivados de eucariotas con un genoma de referencia requiere del conocimiento de las secuencias de intrones, que están ausentes en el ARNm maduro. Los alineadores realizan una ronda adicional de alineación para identificar específicamente las uniones de empalme, informadas por su ubicación en la referencia o por secuencias canónicas de estos sitios. La identificación de estas uniones evita que las lecturas se desalineen o se descarten por error, lo que permite alinear más lecturas con el genoma de referencia y mejorar la precisión de las estimaciones de expresión génica. Debido a que la regulación génica puede ocurrir a nivel de isoformas de ARNm, las alineaciones que consideran el empalme también permiten la detección de cambios en la abundancia a ese nivel. El ensamblaje *de novo* implica alinear lecturas entre sí para construir secuencias de transcripción de longitud completa sin el uso de un genoma de referencia (J. R. Miller et al., 2010). El porcentaje de lecturas mapeadas y la distribución de lecturas también son indicadores globales de la precisión general de la secuenciación y de la presencia de ADN contaminante.

1.2.3. Cuantificación

La cuantificación de las secuencias alineadas se puede realizar a nivel de gen, exón o transcrito. Esta aplicación se basa principalmente en la cantidad de lecturas que se asignan a cada transcripto, aunque existen algoritmos como *Sailfish* que se basan en el conteo de k-meros en lecturas sin necesidad de mapeo (Patro et al., 2014). El enfoque más simple para la cuantificación es agregar conteos crudos de lecturas alineadas (*raw counts*) mediante programas como *HTSeq-count* (Anders et al., 2015) o *featureCounts* (Liao et al., 2014). Este enfoque de cuantificación a nivel de gen (en lugar de a nivel de transcripción) utiliza un archivo de formato de transferencia de genes (GTF) que contiene las coordenadas en el genoma de exones y genes y, a menudo, descarta lecturas múltiples. La cuantificación a nivel del transcripto es más compleja y requiere métodos probabilísticos para estimar la abundancia de isoformas de la transcripción, implementados en programas específicos como, por ejemplo, *cufflinks* (Trapnell et al., 2010). Las lecturas que se alinean igualmente bien con varias ubicaciones deben identificarse y eliminarse, alinearse con una de las ubicaciones posibles o alinearse con la ubicación más probable. Los resultados típicos de la cuantificación incluyen una tabla de recuentos de lecturas de formato general para todas las entidades (*features*) suministradas al software, por ejemplo, los genes.

1.3. Análisis de expresión diferencial

Como se mencionó previamente, el número de lecturas asignadas en un experimento de *RNA-Seq* a un gen o transcrito determinado (*raw counts*) se considera una estimación del nivel de expresión de esa *feature.* Esta se organiza como una matriz con filas que representan las *features* y columnas que representan muestras de una o más poblaciones. La expresión génica diferencial se realiza entonces siguiendo una serie de pasos como normalización, modelando y análisis estadístico. Si bien la mayoría de los programas especializados lee una tabla de genes conteos, algunos como *cuffdiff*, aceptan directamente los alineamientos en un formato particular. Los resultados finales de estos análisis son listas de genes con estadísticos de a pares asociados a la expresión diferencial entre tratamientos.

1.3.1. Normalización

La experiencia con datos de *microarray* ha demostrado que la normalización es un componente crítico del análisis para obtener una estimación precisa de la expresión diferencial (DE, *differential expression*) (Bolstad et al., 2003). En el mismo sentido, el análisis de los datos de *RNA-seq* muestra algunas dificultades inherentes a los procedimientos de secuenciación. Por ejemplo, la cobertura de lecturas puede no ser uniforme a lo largo del genoma debido a la variación en la composición de nucleótidos entre regiones (contenido de guanina-citosina, GC) (Pickrell et al., 2010; Risso et al., 2011). Un problema similar, es que los transcriptos largos se espera que produzcan más lecturas que los transcriptos cortos con un mismo nivel de expresión (Oshlack & Wakefield, 2009). En el análisis de expresión diferencial, donde los genes se analizan individualmente para detectar diferencias de expresión entre condiciones, estos sesgos *dentro de la muestra* (*within-lane*) generalmente se ignoran, ya que se supone afectan a todas las muestras de manera similar (Oshlack et al., 2010).

Otros tipos de falta de uniformidad son observados entre las muestras procesadas (*between-lane*). En primer lugar, la profundidad de secuenciación o tamaño de biblioteca[1] que repercute en el número total de lecturas mapeadas suele ser diferente para diferentes muestras, lo que significa que los conteos observados no son directamente comparables entre muestras (Conesa et al., 2016; Mortazavi et al., 2008). Por ejemplo, si una muestra se secuencia al doble de la profundidad de otra, es esperable que todos los genes obtengan el doble de conteos en la primera muestra en comparación con la segunda, incluso en ausencia de una verdadera expresión diferencial. También pueden observase variaciones no deseadas asociadas al lote de secuenciación (*batch effect*) (Leek et al., 2010).

Las estrategias RPKM, FPKM y TPM normalizan el factor más importante para comparar muestras, que es la profundidad de secuenciación, ya sea directamente o considerando el número de transcriptos. RPKM (*reads per kilobase of exon model per million mapped reads*) (Mortazavi et al., 2008) también es un método de normalización dentro de la muestra, elimina tanto los efectos de profundidad como de

[1] La profundidad secuenciación (*sequencing depth*) se puede calcular como N × L/G, donde N es el número de lecturas, L es la longitud de lectura promedio y G es la longitud del genoma original. Por ejemplo, N = 8 lecturas para un genoma con G = 2000 pares de bases con una longitud promedio L = 500 tendrán una profundidad de secuencia de 2 o 2 veces de redundancia. Esto también es equivalente al porcentaje del genoma cubierto por lecturas y el número promedio de veces que se lee una base. Una mayor cobertura puede mejorar el poder estadístico del estudio.

longitud transcriptos. Esta medida y sus derivados posteriores como FPKM (*fragments per kilobase of exon model per million mapped reads*) (Trapnell et al., 2010), y TPM (*transcripts per million*) (B. Li & Dewey, 2011; Wagner et al., 2012) son las usadas con mayor frecuencia. RPKM y FPKM son equivalentes cuando se trata de lecturas *single-end*, y FPKM puede convertirse en TPM mediante una fórmula simple (Yingdong Zhao et al., 2021).

Si bien la forma más sencilla de abordar el sesgo de profundidad es reescalar, esta normalización generalmente no es suficiente para obtener muestras comparables. La razón es que incluso si los tamaños de la biblioteca son realmente idénticos, los recuentos de *RNA-Seq* representan inherentemente abundancias relativas de los genes. Unos pocos genes altamente expresados pueden contribuir con una gran parte de las lecturas secuenciadas en un experimento, dejando solo unas pocas lecturas para distribuir entre los genes restantes (Bullard et al., 2010). La normalización de RPKM, FPKM y TPM son métodos basados en conteos totales o efectivos, y tienden entonces a tener un rendimiento deficiente cuando las muestras poseen distribuciones de transcripción heterogéneas (Bullard et al., 2010). Los métodos de normalización que tienen en cuenta este sesgo son TMM (*trimmed mean of M-values*) (Robinson & Oshlack, 2010) y la normalización proporcionada en el paquete *DESeq* (Anders & Huber, 2010). Estos procedimientos ignoran características altamente variables y/o altamente expresadas e incluyen la estimación de factores de normalización específicos de la muestra que se utilizan para cambiar la escala de los recuentos observados. Con estos métodos de normalización, la suma de los conteos normalizados en todos los genes no es necesariamente igual entre las muestras (como sería si solo se usaran los tamaños de la biblioteca para la normalización), pero el objetivo es, en cambio, hacer que los conteos normalizados para los genes no expresados diferencialmente sean similares entre las muestras. Un ejemplo análogo puede encontrarse en el problema de cómo comparar correctamente un *Velociraptor* y un *Tyrannosaurus Rex*, vs una jirafa y un caballo (figura 14).

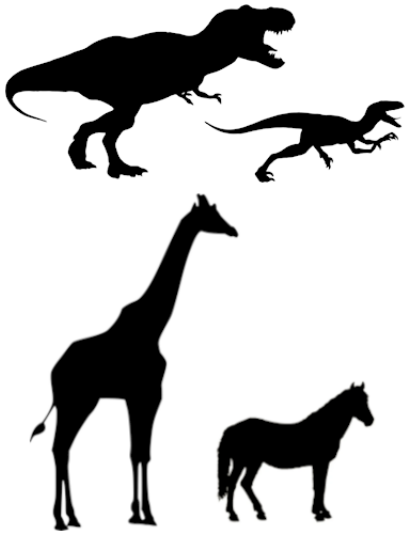


Figura 14. Estrategias de normalización y su analogía en la comparación de animales. Una estrategia posible para comparar adecuadamente la anatomía de las dos primeras especias sería normalizar de acuerdo a la estatura o el peso de los mismos, lo que revelaría la diferencia importante de tamaño relativo de los miembros superiores. Sin

embargo la misma estrategia aplicada en el segundo caso se ve seriamente distorsionada por el extenso cuello de la jirafa.

1.3.2. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos en estudios ómicos pueden categorizar como métodos univariados o multivariados. Los métodos univariados son métodos de selección que consideran una *feature* (transcripto, metabolito, etc.) a la vez según su capacidad discriminante. Los métodos multivariados consideran el efecto combinatorio, la sinergia, de múltiples variables (X. Zhang et al., 2006). Los métodos multivariados pueden categorizarse a su vez como supervisados o no supervisados, siendo los métodos supervisados aquellos que consideran explícitamente la pertenencia a una clase muestral. Los métodos no supervisados se utilizan principalmente para evaluar la estructura general de los datos, mientras que los métodos supervisados se pueden aplicar para la selección de *features*. Estos últimos pueden verse comúnmente utilizados en estudios de metabolómica y proteómica.

Los métodos univariados evalúan generalmente *valores-p*, ya sea a través de enfoques paramétricos o pruebas de permutación. Debido a que miles de metabolitos pueden medirse simultáneamente en un estudio no dirigido, el problema de prueba de hipótesis múltiples dará como resultado una alta probabilidad de falsos descubrimientos (falsos positivos), incluso con un umbral de *valor-p* pequeño. La tasa de falsos descubrimientos (FDR, *valor-q*), calculada de múltiples maneras, se utiliza para estimar la probabilidad de falsos positivos en un umbral estadístico dado, o en otros términos, para controlar el número total de descubrimientos falsos. Alternativamente, es común en estudios de metabolómica el uso de métodos supervisados multivariados para la selección de *features,* basándose estos en otras métricas (ver sección *Fundamentos de metabolómica*) (Saeys et al., 2007).

Los análisis transcriptómicos recurren a métodos univariados especializados para evaluar la expresión diferencial los transcriptos. Dado que la cuantificación de *RNA-seq* se basa en conteos de lecturas que se asignan absoluta o probabilísticamente a ciertos transcriptos, los primeros enfoques para calcular la expresión diferencial utilizaron distribuciones de probabilidad discretas, como *Poisson* o binomial negativa (*gamma-Poisson*) (Anders & Huber, 2010; Robinson & Smyth, 2007). En esta línea se encuentran las herramientas frecuentemente usadas *edgeR* y *DESeq2*, que proporcionan sus propios métodos de normalización para un análisis integrado (Anders & Huber, 2010; Love et al., 2014; Robinson et al., 2010). Alternativamente se han desarrollado métodos que transforman los conteos previamente normalizados y consideran la estructura de varianza de los datos, tal como *limma-voom*, funcionando bien en comparación con los anteriores (Law et al., 2014; Soneson & Delorenzi, 2013). En este mismo sentido, luego de ser normalizados (TMM, etc.), los datos ya pueden haber perdido su naturaleza discreta y parecerse más a una distribución continua.

Los análisis multivariados y no supervisados suelen ser el primer paso en el análisis de datos, ya que permiten visualizarlos y detectar tendencias generales. Para ello reducen la dimensionalidad de los datos de una manera interpretable, conservando a la vez la mayor parte de la información contenida. El análisis de componentes principales (PCA) es uno de los algoritmos de reducción de dimensiones más antiguos y más utilizados (figura 15). Este se traduce en encontrar un nuevo conjunto de variables denominadas componentes principales (PC), que son funciones lineales de las del conjunto de datos

original. Estas maximizan sucesivamente la varianza y no están correlacionadas entre sí (Jolliffe, 2005; Scholz et al., 2004). Encontrar estas nuevas variables, las componentes principales, se reduce a resolver un problema de valores propios/vectores propios o, alternativamente, a partir de la descomposición en valores singulares (SVD) de la matriz de datos (centrada). Las nuevas variables están definidas por el conjunto de datos en cuestión, no a priori, lo que convierte a PCA en una técnica de análisis de datos adaptativa. Dada una matriz de datos $\boldsymbol{X}$ ($n \times p$), el modelo PCA sigue la ecuación: $\boldsymbol{X = T_K P'_K + E_K}$. Donde $\boldsymbol{T_K}$ es la matriz de *scores* $n \times K$ que contiene la proyección de las observaciones en el espacio K-dimensional definido por las primeras K componentes principales, $\boldsymbol{P_K}$ es la matriz $p \times K$ de *loadings*, que son los coeficientes en la combinación lineal de las variables originales que definen cada componente principal, y $n \times p$ es la matriz $\boldsymbol{E_K}$ que contiene los residuos estadísticos. Los *scores* representan los datos originales en el nuevo sistema de coordenadas y los *loadings* son los pesos aplicados a los datos originales durante el proceso de proyección. La primera PC representa la variación máxima de datos, mientras que cada PC sucesiva representa una variación progresivamente menor. En PCA, el gráfico de *scores* con dos o tres PC representando la máxima varianza de los datos se usa principalmente para visualizar grupos de fenotipos, mientras que la gráfica de *loadings* muestra el impacto de las variables en cada vector (cuanto más lejos del centro de coordenadas, mayor influencia). Si el agrupamiento generado coincide con el conocimiento previo (fenotipo, genotipo, curso de tiempo, respuesta a la dosis, etc.), las *features* con mayores pesos en los vectores de *loading* de los primeros componentes principales se consideran más relevantes para el problema biológico en cuestión. Debe considerarse que un PCA no garantiza que las direcciones de máxima variación contengan las características más discriminantes. También es importante recordar que PCA es muy sensible a los valores atípicos. La normalización de los datos y la eliminación de valores atípicos suelen ser necesarios para obtener buenos resultados.

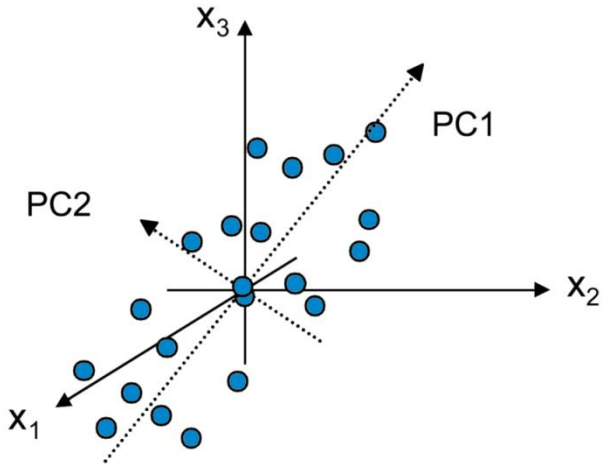


Figura 15. Diagrama de una análisis PCA. PCA puede entenderse como la maximización de la varianza de las coordenadas de proyección. El primer componente principal, PC1, es la línea que mejor explica la forma de la población de puntos. Representa la dirección de variación máxima en los datos. Cada observación puede proyectarse sobre esta línea para obtener un valor de coordenadas a lo largo de la línea PC. Este valor se conoce como puntaje (*score*). El segundo componente principal, PC2, está orientado de manera que refleja la segunda mayor fuente de variación en los datos, siendo ortogonal al primer PC. PC2 también pasa por el punto medio. Adaptado de (Eriksson et al., 2005).

Además de los métodos de visualización como PCA, los algoritmos de agrupamiento (*clustering*) se enfocan explícitamente a identificar grupos en el conjunto de datos original. Utilizan diferentes medidas de similitud o funciones de distancia, como coeficientes de correlación para organizar los elementos más similares en grupos distintos. El *clustering* por k-medias (*k-means*) es un método de particionado basado en el centroide (Hartigan & Wong, 1979). El centroide indica que cada grupo se puede representar mediante un vector central, que no necesariamente es una observación en el conjunto de datos original. El *clustering* por *k-means* divide a los sujetos en *k* grupos que no se superponen, de modo que cada sujeto pertenece a la media más cercana del grupo correspondiente. Alternativamente el *clustering* jerárquico (S. C. Johnson, 1967) anida los agrupamientos en un árbol jerárquico (dendrograma) que puede proporcionar algún hallazgo novedoso de la estructura real del conjunto, aunque puede ser sensible a los valores atípicos. Además de una función de distancia, se utiliza una métrica de similitud entre pares de clústeres, denominada función de enlace, para anidar los clústeres. Las funciones de distancia comúnmente utilizadas para la agrupación son euclidiana, Manhattan y Mahalanobis, mientras que las funciones de enlace comunes incluyen enlace único (*single linkage*), enlace completo (*complete linkage*) y enlace promedio (*average linkage*) (Ren et al., 2015).

1.4. Análisis funcional

El último paso en un estudio de transcriptómico típico suele ser la caracterización de las funciones o vías moleculares en las que están implicados los genes expresados diferencialmente (*differentially expressed genes*, DEGs). Los dos enfoques principales, desarrollados primero para la tecnología de *microarrays,* son (a) comparar una lista de DEGs con el resto del genoma para funciones sobrerrepresentadas, y (b) análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (*gene set enrichment analysis*, GSEA), que se basa en el ordenamiento del transcriptoma según una medida de expresión diferencial (ej. *fold change*) (D. W. Huang et al., 2009).

1.4.1. Anotación

El análisis funcional requiere la disponibilidad de suficientes datos de anotación funcional para el transcriptoma en estudio. Recursos como *Gene Ontology* (Ashburner et al., 2000), *Bioconductor* (Huber et al., 2015), DAVID (D. W. Huang et al., 2008) o *Babelomics* (I. Medina et al., 2010) contienen datos de anotación para la mayoría de las especies modelo. Sin embargo, transcriptos nuevos descubiertos durante el ensamblaje o la reconstrucción *de novo* de un transcriptoma pueden carecer de información funcional por lo que la anotación es necesaria en esos casos. Las transcriptos codificantes de proteínas se pueden anotar funcionalmente usando ortólogos registrados en bases de datos de proteínas como *SwissProt* (Bairoch et al., 2004) y en bases de datos que contienen dominios de proteínas conservados como *Pfam* (Finn et al., 2014) e *InterPro* (Hunter et al., 2012). El uso de un vocabulario estándar como *Gene Ontology* (GO) permite cierta intercambiabilidad de información funcional entre ortólogos. Herramientas de uso frecuente como *Blast2GO* permiten la anotación masiva de conjuntos completos de datos de transcriptoma en una variedad de bases de datos y vocabularios controlados (Conesa et al., 2005; D. W. Huang et al., 2009). Por lo general, entre el 50 y el 80 % de las transcripciones reconstruidas a partir de datos de *RNA-seq* se pueden anotar con términos funcionales de esta manera. Sin embargo, los datos de *RNA-seq* también revelan que una fracción importante del transcriptoma carece de

potencial de codificación de proteínas. La anotación funcional de estos ARN largos no codificantes es más desafiante ya que suelen estar menos conservados que los genes codificantes de proteínas. La base de datos Rfam (Gardner et al., 2009) contiene la mayoría de las familias de ARN mejor caracterizadas, como los ARN ribosomal o de transferencia, mientras que mirBase (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014) o Miranda (Enright et al., 2003) están especializadas en micro ARN. Estos recursos se pueden utilizar para la anotación basada en la similitud de ARN cortos no codificantes, pero aún no hay procedimientos de anotación funcional estándar disponibles para otros tipos de ARN, como los ARN largos no codificantes.

1.4.2. Análisis de rutas

En general, las vías biológicas se pueden dividir en vías de señalización génica y vías metabólicas. Las vías de señalización génicas son gráfos que usan nodos (*nodes*) para representar genes o productos de genes y aristas (*edges*) para representar interacciones entre uno u otro elemento. Asimismo las rutas metabólicas usan nodos para representar compuestos y aristas para describir reacciones bioquímicas que involucran dichos compuestos. Dado que estas reacciones suelen llevarse a cabo mediante enzimas que están codificadas por genes, en una ruta metabólica los genes están asociados con aristas en lugar de nodos. Idealmente, un método integral de análisis de vías podría tener en cuenta todos los aspectos de los fenómenos descritos por una vía.

Los métodos que tratan las vías como conjuntos de genes simples siguen siendo populares porque se pueden aplicar igualmente bien a las rutas de señalización, las rutas metabólicas, los términos GO, así como a conjuntos arbitrarios de genes. Dos de los métodos más populares son el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) (Subramanian et al., 2005) y el análisis de conjuntos de genes (GSA) (Efron & Tibshirani, 2007). Estos son métodos de puntaje de clase funcional (Ackermann & Strimmer, 2009; Goeman & Bühlmann, 2007). Para un experimento simple de dos grupos (por ejemplo, enfermo versus normal), tanto GSEA como GSA comienzan con el cálculo de un estadístico-*t* para cada gen medido en la matriz. Luego, se calcula un puntaje para cada conjunto de genes utilizando los valores *t* de todos los genes en el conjunto de genes. La importancia del puntaje para el conjunto de genes se determina mediante el uso de permutaciones de las muestras. Ambos enfoques tratan a todo los genes en el conjunto por igual. La identificación de vías involucradas en varias condiciones a través de estos enfoques se ha convertido en un análisis ubicuo gracias a recursos como KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (M Kanehisa & Goto, 2000), *BioCarta* (*www.biocarta.com*) y *Reactome* (Joshi-Tope et al., 2005).

Idealmente, un método integral de análisis de rutas podría tener en cuenta todos los aspectos de los fenómenos descritos por una vía. Estos aspectos incluirían la posición y el papel de cada gen en una vía, los tipos de señales entre genes, la eficiencia de la interacción entre un gen u otro, o la eficiencia con la que se lleva a cabo una determinada reacción, condiciones limitantes de la velocidad, etc. Dichos métodos se han propuesto tanto para vías de señalización (Draghici et al., 2007; Massa et al., 2010; Tarca et al., 2009; R. Thomas et al., 2009), como para vías metabólicas (Massa et al., 2010; R. Thomas et al., 2009), pero actualmente no se dispone de ningún método para analizar ambos tipos de vías teniendo en cuenta toda la información disponible.

2. Estrategia experimental (transcriptómica)

Los astrocitos neurotóxicos Tg.Old son una valiosa herramienta para entender cambios celulares y moleculares potencialmente presentes en el microambiente inflamatorio de la EA, por lo que en esta tesis nos propusimos profundizar en la caracterización de su fenotipo mediante aproximaciones ómicas. El análisis transcriptómico se realizó sobre cultivos astrocitarios desarrollados a partir de corteza e hipocampo de ratones sintomáticos 3xTg-AD (>9 meses de edad) —Tg.Old—, ratones no sintomáticos 3xTg-AD (neonatales, P1-2) —Tg.Neo— y ratones no transgénicos (C57BL/6J neonatales, P1-2) —Wt.Neo—. Estos cultivos de animales sintomáticos fueron desarrollados y recientemente caracterizados por los investigadores del área de I+D Biomédico del CUDIM en base a la experiencia previa en un modelo de ELA (Diaz-Amarilla et al., 2022; Díaz-Amarilla et al., 2011). Debido a las dificultades para obtener astrocitos a partir de animales adultos no transgénicos (baja proliferación), se utilizaron como control los astrocitos obtenidos a partir de animales neonatos. Estos controles permitieron evidenciar en un estudio precedente que los astrocitos 3xTg-AD no exhiben toxicidad antes del inicio de la enfermedad. Como se mencionó anteriormente, el modelo murino triple transgénico 3xTg-AD expresa las mutaciones humanas APPswe y tauP301L en un ratón *knock-in* para PS1M146V (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003). Estos transgenes desarrollan un fenotipo neuropatológico asociado con el envejecimiento que incluye tanto la formación de placa amiloide como la formación de ovillos neurofibrilares (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003). Asimismo, en este modelo la disfunción sináptica y la patología axonal preceden a la deposición de Aβ y a la agregación de tau (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al., 2003).

Los cultivos astrocitarios se desarrollaron en placas de 35 mm y se colectaron muestras correspondientes a tres experimentos independientes. Considerando las metodologías aplicadas en cultivos similares, optamos por seguir una estrategia de extracción con *Trizol* seguida de una purificación en columna (*Pure Link RNA mini kit*) y remoción de posible ADN contaminante con una enzima DNAasa. Las muestras de ARN total fueron secuenciadas por la empresa *GeneWiz* obteniendo archivos crudos de lecturas pareadas de 150 pares de bases.

El procesamiento y análisis de los datos crudos se realizó siguiendo protocolos de referencia en el área (Y. Chen et al., 2016; Love et al., 2015; Smyth et al., 2018) e involucró las siguientes etapas:

1. Control de calidad de secuenciación utilizando la herramienta *FastQC* (Andrews, 2010).
2. Recorte de secuencias consideradas de baja calidad así como secuencias de empalme o marcado mediante la herramienta *SeqPurge* (Sturm et al., 2016). Frente a otras consideradas (*FlexBar, Trommomatic*) esta fue la más adecuada para el tipo de secuenciación (lecturas pareadas de 150 pares de bases con adaptadores *NEBNext*).
3. Alineamiento, anotación y conteo. Se consideraron herramientas implementadas en *R*, un entorno y lenguaje de programación enfocado al análisis estadístico. Además de ser computacionalmente eficiente, gracias a su modularidad facilita su asociación con otras herramientas y la construcción de un flujo de trabajo. Se utilizaron los paquetes de *R Rsubread* y *FeatureCounts* para alinear las lecturas contra un genoma de referencia (ratón *GRCm38*) y cuantificar respectivamente (Liao et al., 2014, 2019). Se utilizó la anotación para ratón mm9 de la base de datos *RefSeq* de NCBI.

4. Análisis estadístico. Empleando los paquetes de *R edgeR* y LIMMA se procedió a la remoción de transcriptos poco expresados, normalización, y detección de transcriptos diferencialmente expresados (Law et al., 2014; M. E. Ritchie et al., 2015). Este paquete aplica estadística multivariada (*PCA*) y univariada (LIMMA-ANOVA) para detectar las diferencias entre los grupos experimentales.
5. Análisis de enriquecimiento funcional y de vías de señalización. El objetivo de esta etapa es sintetizar e interpretar resultados estadísticos en un contexto biológico e identificar relaciones que puedan no ser aparentes en una primera instancia. Se recurrió a dos estrategias de uso común basadas en información manualmente curada y de acceso libre: el análisis de ontología génica (GO), y el análisis de rutas celulares (ej. KEGG) (Ashburner et al., 2000; Minoru Kanehisa et al., 2017). Tal como se describió anteriormente, GO es un proyecto que provee de un vocabulario controlado que describe los atributos de cada gen y sus productos en cualquier organismo. Las anotaciones comprenden tres categorías cada cual representando un concepto clave en biología molecular: la función molecular de los productos génicos; su rol en los procesos biológicos de múltiples direcciones; y su localización en componentes celulares. KEGG es una de las colecciones más utilizadas conteniendo datos en línea de genomas, rutas enzimáticas, y químicos biológicos. Para lograr un resultado más exhaustivo se consideraron varias herramientas de análisis (paquetes GAGE, *camera* y *goana*) (Luo et al., 2009; D. Wu & Smyth, 2012; Young et al., 2010). Los resultados de ontología génica se refinaron con la herramienta *GOxploreR* que considera la jerarquía de los términos (Manjang et al., 2020). Los esquemas coloreados de KEGG se generaron con *KEGG Mapper color tool* (Minoru Kanehisa et al., 2017) y *Pathview* (Luo & Brouwer, 2013). Esquemas suplementarios de interacción proteína-proteína se realizaron con el servidor STRING (Szklarczyk et al., 2019).

Luego de esta primera instancia de análisis de datos se verificaron experimentalmente algunas alteraciones relevantes para el funcionamiento de los astrocitos. En particular se evaluó mediante *western blot* el cambio en la expresión proteica de Nestina y GLT-1 (anticuerpos ab11306 Abcam y PA5-17099 Thermo Fisher, respectivamente). Nestina es una proteína de filamento intermedio (tipo VI) expresada por los progenitores de la glía radial y neuroepitelio en el cerebro embrionario pero no en astrocitos maduros (Potokar et al., 2020; Tohyama et al., 1992). Se asocia también con astrocitos reactivos y gliomas (J. M. Cho et al., 2013; Ishiwata et al., 2011). El transportador GLT-1 participa en la eliminación de glutamato de la sinapsis por parte de los astrocitos (Hu et al., 2003). Su disfunción se ha asociado con procesos patológicos en varias enfermedades humanas y en modelos animales, así como reactividad astrocitaria (Díaz-Amarilla et al., 2011; Escartin et al., 2021). Finalmente, como un enfoque para confirmar alteraciones a nivel mitocondrial, se recurrió a un coctel de anticuerpos dirigidos a distintas subunidades de los complejos de la cadena de transporte de electrones (*OxPhos Rodent WB Antibody Cocktail* 45-8099 Thermo Fisher). Para todos los experimentos se utilizó β-actina como control de carga.

3. Resultados y discusión (transcriptómica)

3.1. Características globales del perfil transcriptómico de astrocitos Tg.Old

Existe un interés creciente por estudiar el papel de otros procesos y tipos celulares como los astrocitos en la progresión de la EA (De Strooper & Karran, 2016). Estas células tienen roles esenciales para el funcionamiento del sistema nervioso (Sofroniew & Vinters, 2010). Frente al daño tisular, sufren diversas alteraciones, adquiriendo un fenotipo reactivo con el fin de restaurar la homeostasis (Linnerbauer & Rothhammer, 2020; Sofroniew & Vinters, 2010). Esta respuesta ocurre tempranamente en la EA y permanece activa durante todo su curso, pero su acción no logra restaurar la homeostasis de los tejidos e incluso podría ser perjudicial (Acioglu et al., 2021; Escartin et al., 2021; Onyango et al., 2021; Sofroniew, 2009, 2020; Sofroniew & Vinters, 2010; Tejera et al., 2019). En este contexto, los astrocitos Tg.Old, aislados de ratones 3xTg-AD sintomáticos, presentan características atípicas en comparación con aquellos derivados de ratones no sintomáticos (transgénicos o no) (Diaz-Amarilla et al., 2022). Se destaca un aumento de su capacidad proliferativa y un efecto neurotóxico sobre neuronas corticales/hipocampales, tanto en cocultivo como tras la exposición a su medio condicionado (Diaz-Amarilla et al., 2022). Estas células siguen un patrón común observado en otros modelos, lo que apoya la hipótesis de que podrían contribuir al proceso neurodegenerativo de la EA (Díaz-Amarilla et al., 2011; Villarreal et al., 2016; Zamanian et al., 2012).

En esta tesis profundizamos en la caracterización molecular de los astrocitos neurotóxicos Tg.Old mediante herramientas ómicas. Los resultados del análisis del transcriptoma distinguen nuevamente a estas células y confirman la mayor similitud entre los grupos controles (Tg.Neo, aislados de animales 3xTg-AD neonatales y Wt.Neo, aislados de animales C57 neonatales). Esto se aprecia tanto mediante análisis de agrupamiento (PCA y *clustering*) como tras un ensayo de expresión diferencial donde puede identificarse una cantidad importante de genes alterados únicamente en los astrocitos Tg.Old (figura 16). Los astrocitos derivados de ratones 3xTg-AD no presentarían entonces alteraciones significativas en etapas tempranas. Esto apoya la hipótesis de que el fenotipo neurotóxico es un producto de la edad y la progresión de la enfermedad, pero no de la acción directa de los transgenes.

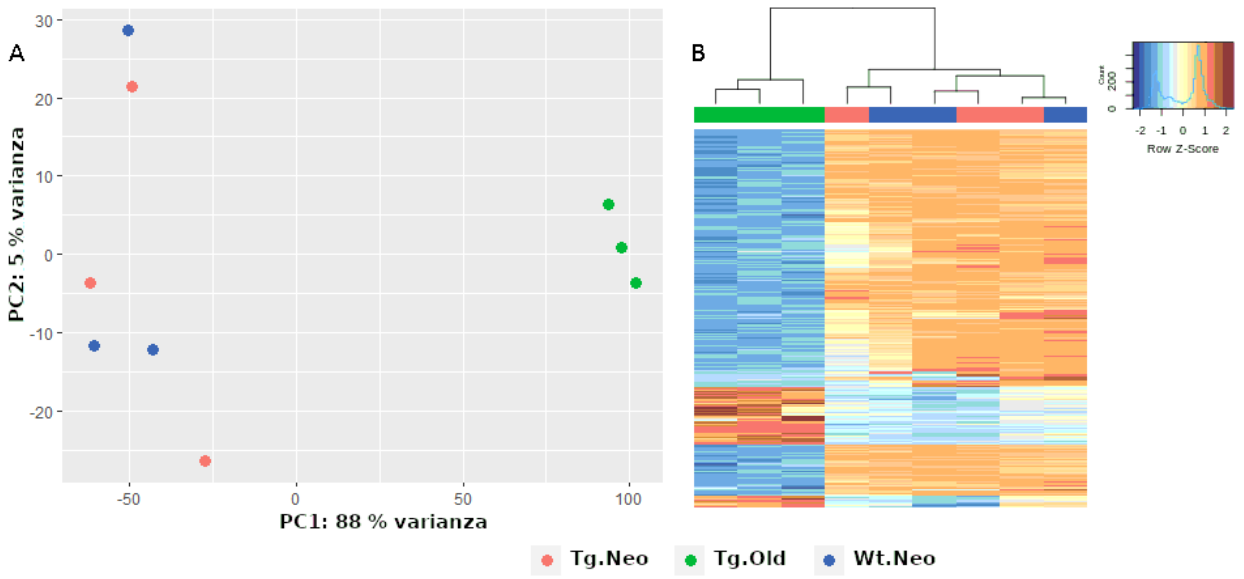


Figura 16. Análisis estadístico multivariado de transcriptomas de astrocitos. A: análisis de componentes principales (PCA). B: agrupación jerárquica de los 500 transcriptos más variables.

3.1.1. Expresión de marcadores astrocíticos y marcadores asociados a reactividad

La diversidad de astrocitos se extiende a través de dimensiones tanto anatómicas como de desarrollo, además de diferenciarse en estados reactivos bajo condiciones de estrés (Khakh & Sofroniew, 2015; Sofroniew, 2020). Múltiples marcadores se han asociado al linaje de los astrocitos y sus diferentes estados, cada uno con diferente grado de especificidad, siendo los marcadores más clásicos GFAP, glutamina sintetasa (GS, Glul), Aldh1l1 y S100b entre otros (Boisvert et al., 2018; Cahoy et al., 2008; Z. Zhang et al., 2019). Como un enfoque para caracterizar los astrocitos Tg.Old evaluamos la expresión de marcadores generalmente asociados de astrocitos en los datos transcriptómicos. Se recopiló una lista de marcadores de fuentes bibliográficas y bases de datos en línea (Boisvert et al., 2018; Cahoy et al., 2008; Molofsky et al., 2012; Y. Zhang et al., 2014) (ver lista completa de marcadores y referencias asociadas en Apéndice 1.1.2). A partir de los datos transcriptómicos analizados, encontramos un grupo de marcadores astrocíticos típicos no expresados diferencialmente (Glul, S100b, Cd44, Gjb6/Cx30, Slc4a4, etc.); un segundo grupo de marcadores regulados a la baja (Gfap, Slc1a2/Glt-1/Eaat2, Nes/Nestin, Aldh1l1, Sox9, Aqp4, Slc1a3/Glast/Eaat1, etc.) y un tercer subconjunto de marcadores de astrocitos regulados al alza (figura 17).

La expresión de varios de estos marcadores en estas células sugiere alteraciones importantes en la función astrocitaria y evidencia su carácter atípico. Entre los transcriptos sobreexpresados se destaca la alteración de Slc7a11, S100a6, Mfge8, Camsap1 y Slc25a28. El intercambiador de cistina-glutamato (xCT, Slc7a11) es un transportador de membrana que promueve la síntesis de glutatión al catalizar la captación de cisteína y la liberación de glutamato (Ottestad-Hansen et al., 2018). S100a6 (Calciclina) es una proteína de unión al calcio involucrada en la degradación proteolítica, la dinámica del citoesqueleto y la proliferación celular y está asociada con precursores neurales y astrocitarios en el hipocampo del ratón (Hoyaux et al., 2002; Yoshioka et al., 2012). La expresión de esta proteína está vinculada a axones

deteriorados tanto en el modelo de ratón con ELA como en pacientes humanos y se induce en astrocitos de ratón después de un accidente cerebrovascular (Hoyaux et al., 2002; Zamanian et al., 2012). El factor Mfge8 (*Milk fat globule epidermal growth factor 8*) es una proteína fagocítica secretada que aumentaría con la edad en el ratón y posiblemente tenga un papel en la regulación de la reactividad astrocitaria (Clarke et al., 2018; T. Li et al., 2019; X. Xu et al., 2019). La proteína Camsap1 (*Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1*) es una proteína asociada al citoesqueleto expresada en astrocitos GFAP-negativos y GFAP-positivos (Yoshioka et al., 2012). En ratas, se observó inmunorreactividad de Camsap1 en células ependimales que portaban varios marcadores de astrocitos y aumentó después de la lesión, lo que sugiere que esto podría ser un marcador de astrocitos recién nacidos (Yoshioka et al., 2012). La proteína transportadora Slc25a28 también podría ser un marcador de disfunción mitocondrial (Babenko et al., 2018).

Asimismo, se evidencia una disminución en la expresión de Gfap, Slc1a2 (GLT-1), y Nes (Nestina) (figura 18). Estas alteraciones se verificaron a nivel de la proteína. GLT-1 y Nestina son presentadas en esta tesis, mientras que GFAP se presentó en la caracterización *in vitro* precedente (Diaz-Amarilla et al., 2022). Nestina es un filamento intermedio, si bien no estaría presente en astrocitos maduros, al igual que GFAP puede aumentar bajo reactividad (J. M. Cho et al., 2013; Potokar et al., 2020). La disminución del transportador de glutamato GLT-1, es especialmente notable dado su rol en la homeostasis de este aminoácido (Perego et al., 2000). Su disminución se ha evidenciado en la EA, así como en astrocitos reactivos de varios contextos patológicos, pudiendo estar asociada a excitotoxicidad por glutamato (Díaz-Amarilla et al., 2011; Escartin et al., 2021; Monterey et al., 2021; Pajarillo et al., 2019).

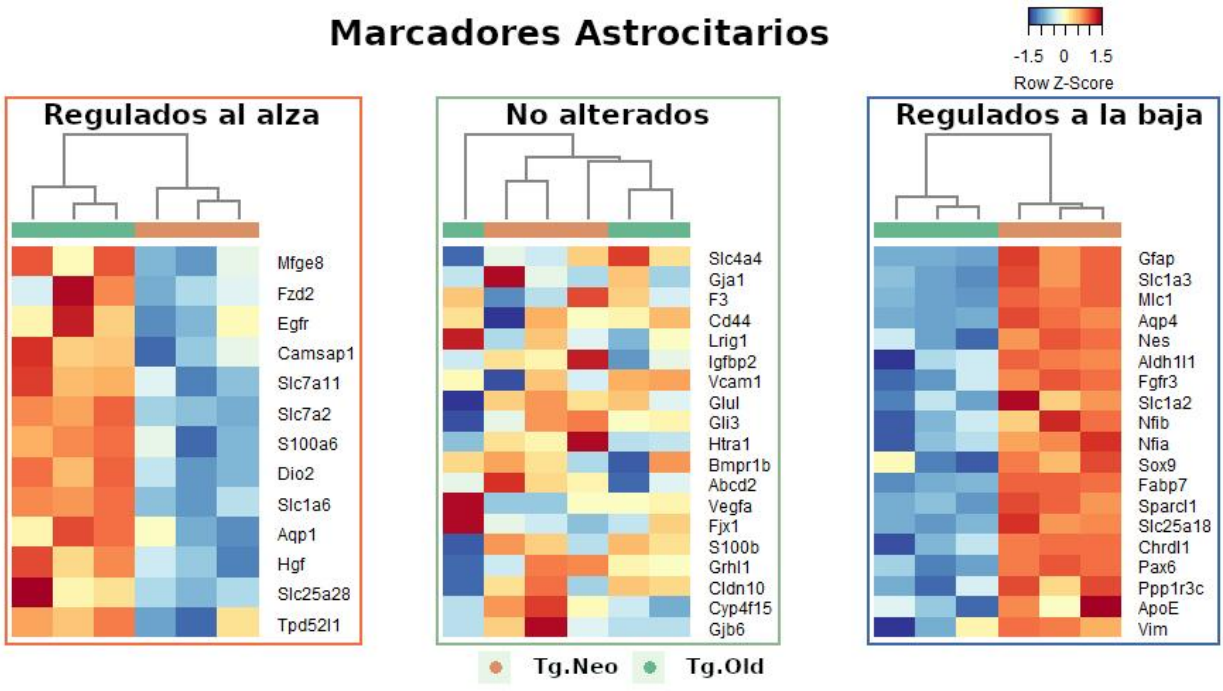


Figura 17. Marcadores de astrocitos regulados al alza, no alterados y regulados a la baja en el transcriptoma de astrocitos Tg.Old. Marcadores asociados a astrocitos se recopilaron de la literatura y de bases de datos en línea (Boisvert et al., 2018; Cahoy et al., 2008; Molofsky et al., 2012; Y. Zhang et al., 2014). Por brevedad, solo se

representa un subconjunto de marcadores (ver lista completa de marcadores y referencias bibliográficas asociadas en Apéndice 1.1.2).

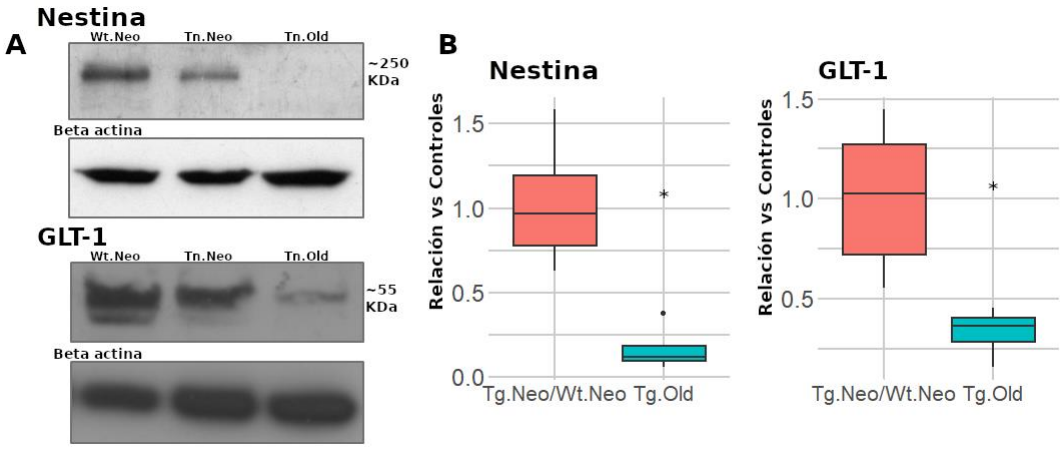


Figura 18. Expresión proteica de los marcadores Nestina y GLT-1. Se siguió un enfoque indulgente para detectar tendencias en la expresión de proteínas: las muestras del grupo Tg.Old se compararon con las muestras de control Tg.Neo y Wt.Neo unidas como un solo grupo, los valores se normalizaron frente a la expresión de beta actina y adicionalmente por la expresión promedio de los controles de cada ensayo (Ralación vs Controles). Bajo este enfoque se observó una reducción en la expresión de ambas proteínas: Nestina (p.adj = 0.004), GLT-1 (p.adj = 0.01) (test de Wilcoxon).

Los marcadores de reactividad son otra forma de caracterizar los patrones de expresión molecular de los astrocitos Tg.Old en el contexto de los trastornos del SNC. En este sentido, se recopiló una lista de alrededor de 300 marcadores asociados con la reactividad a partir de fuentes bibliográficas (Escartin et al., 2021; Jurga et al., 2021; Liddelow & Barres, 2017; Zamanian et al., 2012) (ver lista completa de marcadores y referencias bibliográficas asociadas en Apéndice 1.1.2). A partir de estos, se puede encontrar una fracción de alrededor de 70 marcadores expresados diferencialmente en los datos transcriptómicos en una dirección consistente con la reactividad (se presenta un subconjunto seleccionado en la figura 19). Entre los genes más alterados se encuentra Slc1a2 (Glt1, Eaa2) previamente mencionado, Slc1a3 (Glast) que codifica otro transportador de glutamato y Kcnj10 (Kir4.1). Kir4.1 es un canal de K^+ rectificador interno exclusivo de las células gliales que regula el potencial de membrana en reposo de los astrocitos, el volumen celular y facilita la absorción de glutamato (Nwaobi et al., 2016). Su disfunción se ha asociado con la EA y la ELA, así como con trauma cerebral, isquemia e inflamación (Nwaobi et al., 2016; Olsen et al., 2015; D. M. Wilcock et al., 2009).

Asimismo, se observan alteraciones de varios genes asociados a la clasificación de astrocitos reactivos de tipo inflamatorio "A1" y de tipo isquemico "A2" (figura 19) (Liddelow & Barres, 2017; Zamanian et al., 2012) En particular se destaca Ptgs2, que codifica una enzima proinflamatoria sobreexpresada en la EA (Astakhova et al., 2019; Ho et al., 2001; Yasojima et al., 1999), así como Emp1 y S100a10 presentes en astrogliosis inducida por estrés del retículo (H. L. Smith et al., 2020).

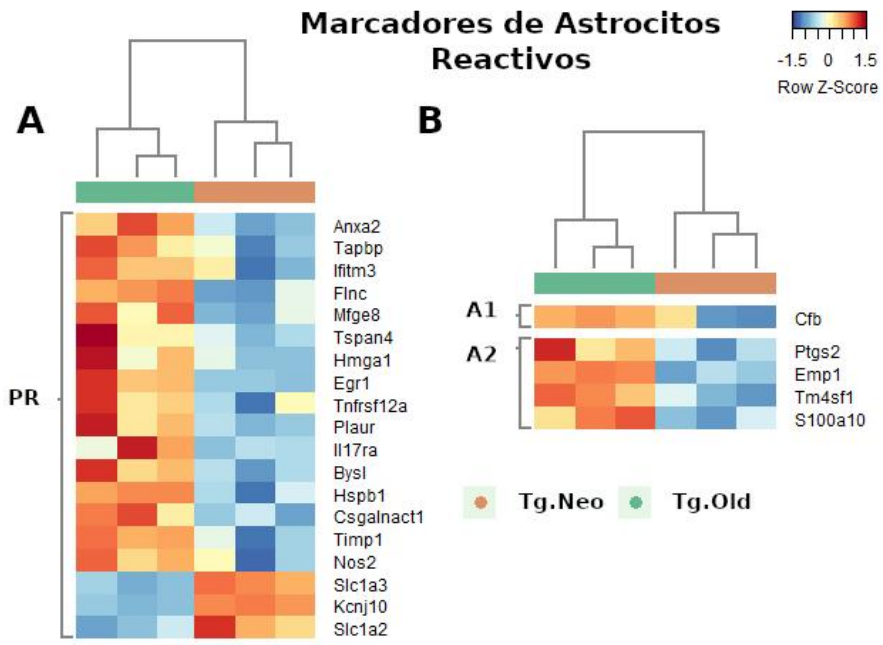


Figura 19. Marcadores de astrocitos reactivos. A. Marcadores asociados con astrocitos reactivos y marcadores "panreactivos" ("PR"). B. Marcadores de astrocitos reactivos tipo "A1" y tipo "A2". Los marcadores se obtuvieron de múltiples referencias bibliográficas (Escartin et al., 2021; Jurga et al., 2021; Liddelow & Barres, 2017; Zamanian et al., 2012). Por brevedad, solo se representa un subconjunto de marcadores de los presentes entre los DEGs con un patrón de expresión consistente con la reactividad (ver lista completa de marcadores y referencias bibliográficas asociadas en Apéndice 1.1.2).

Más detalles y ejemplos de genes alterados asociados a la función astrocitaria pueden encontrarse en Apéndice 1.1.

3.2. *Análisis de ontología y vías de señalización alteradas en el transcriptoma de astrocitos Tg.Old*

Las evidencias del análisis de ontología y enriquecimiento de vías son concordantes con el fenotipo característico de los astrocitos Tg.Old. Por un lado, se sugiere una depresión de procesos biológicos asociados a la regulación del desarrollo del SNC; transporte de iones, particularmente la señalización por calcio; adhesión celular y transmisión sináptica (figura 20, figura 21). Por otro lado, se sugiere una regulación al alza de procesos biológicos asociados a la traducción proteica, la síntesis de ribosomas, respuestas de estrés y factores de crecimiento, proliferación celular y regulación negativa de la muerte celular entre otros (figura 22, figura 23). Se destacan alteraciones en la cascada de síntesis y procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático (ER, *endoplasmic reticulum*), así como alteraciones en rutas cancerígenas y proinflamatorias. Aunque la vía KEGG de la EA no fue priorizada en el análisis, probablemente dada su amplitud y heterogeneidad, en ella se aprecian alteraciones importantes en la mitocondria y el retículo endoplasmático. Estos organelos mantienen una activa comunicación y, siendo fundamentales para el funcionamiento celular, su disfunción está presente en

varias patologías tales como la EA y diabetes (Duran-Aniotz et al., 2017; Schmitz et al., 2018; Wenzhang Wang et al., 2020).

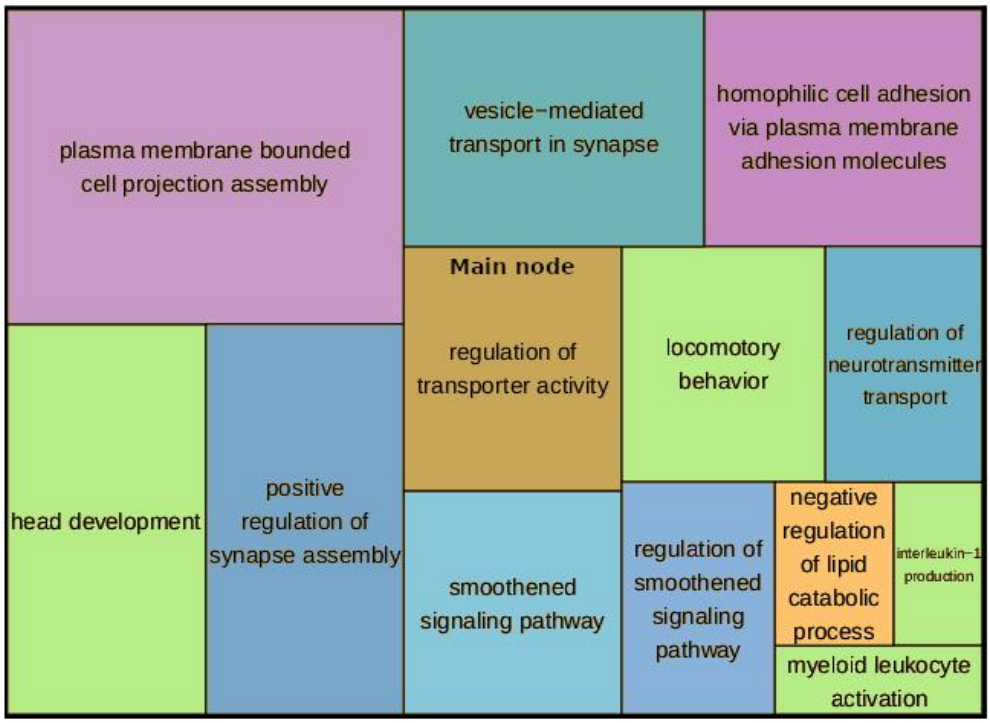


Figura 20. Términos GO enriquecidos asociados con transcriptos regulados a la baja en astrocitos Tg.Viejo. Solo se presenta el nodo principal, ver esquema completo en Apéndice 1.1.1. Cada rectángulo representante de un solo grupo de términos GO, que luego se asocian en 'superclusters' y se muestran en diferentes colores. El tamaño de los rectángulos se ajusta para reflejar el *valor p*.

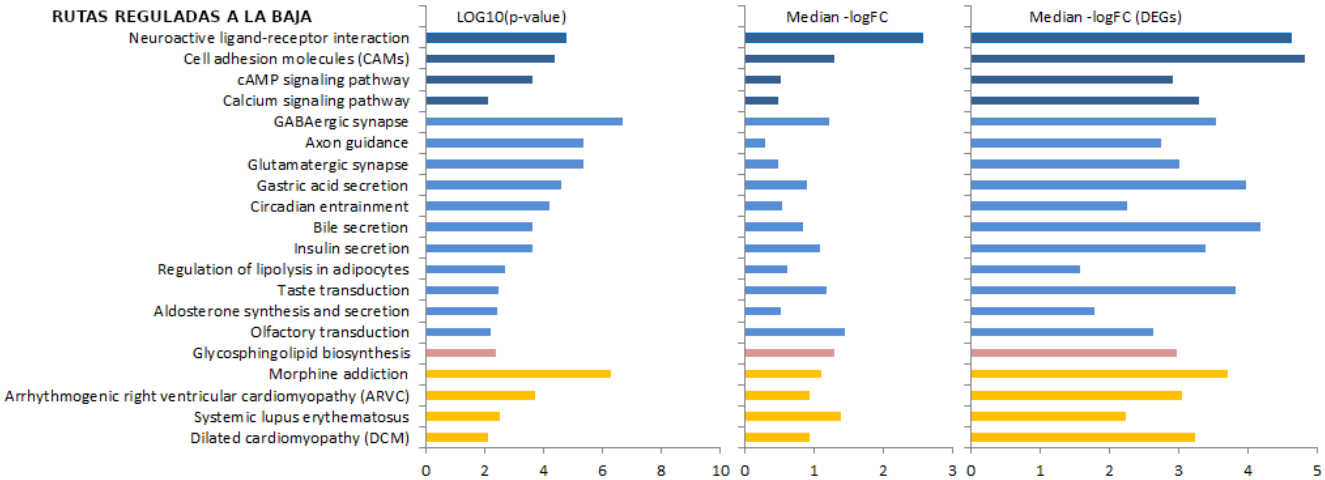


Figura 21. Vías KEGG enriquecidas derivadas de transcritos regulados a la baja en astrocitos Tg.Viejo. Los caminos se organizan según clase KEGG; las vías en azul pertenecen a las siguientes clases: *Transcription*; *Translation*;

Folding, sorting and degradation; azul: *Signal transduction*; *Signaling molecules and interaction*; azul pálido: *Organismal Systems* (*Nervous system*, *Development and regeneration*; etc.); púrpura: *Metabolism*; y amarillo: *Human diseases*. Por brevedad, solo se incluyen las vías más representativas dentro de cada grupo. Consulte el Apéndice 1.1.1 (Fig. S9-10, Table S1-2) para ver la lista completa y el análisis de la superposición de vías. *Log10(p-value)* toma el valor *p* mínimo entre los resultados de GAGE, *camera* y *goana*, *Median logFC* considera la mediana del cambio de expresión de todos los genes detectados en la vía, *Median logFC (DEGs)* está restringido a genes expresados diferencialmente (DEGs). La cantidad total de DEGs involucrados en las vías reguladas a la baja es 494 (354 efectivamente a la baja), con un *logFC* medio de -2,92.

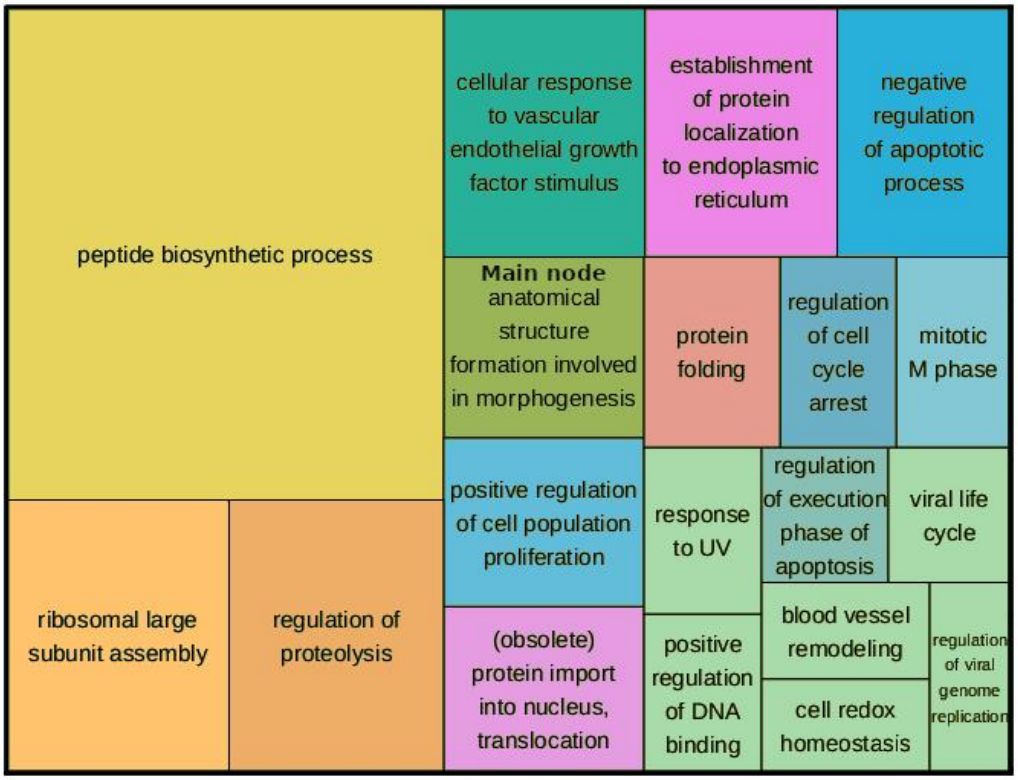


Figura 22. Términos GO enriquecidos asociados con transcriptos regulados al alza en astrocitos Tg.Viejo. Solo se presenta el nodo principal, ver esquema completo en Apéndice 1.1.1. Cada rectángulo representante de un solo grupo de términos GO, que luego se asocian en 'superclusters' y se muestran en diferentes colores. El tamaño de los rectángulos se ajusta para reflejar el *valor p*.

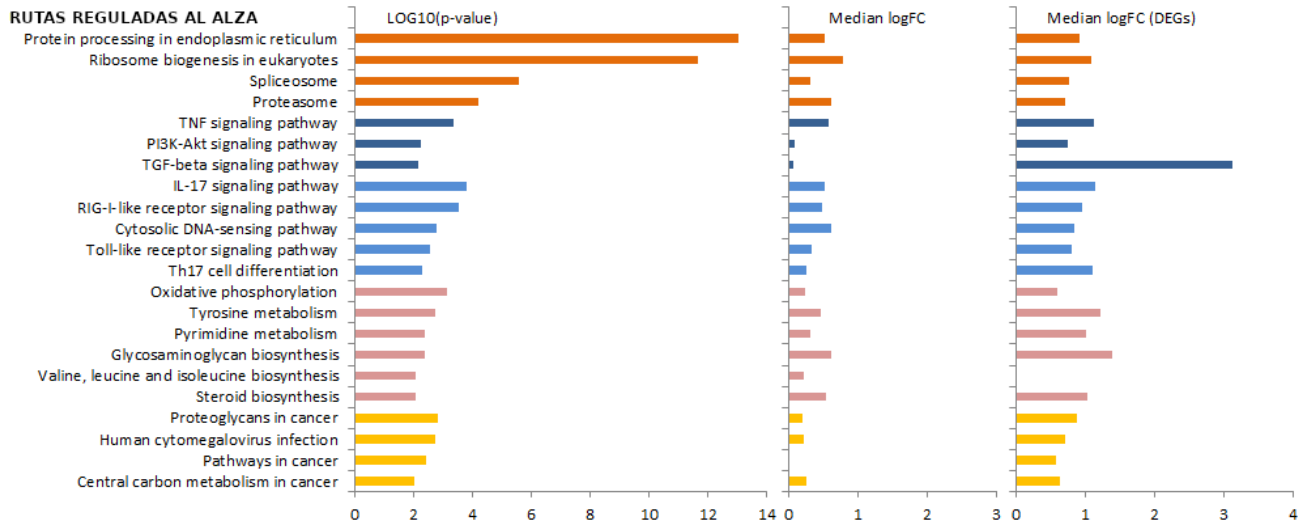


Figura 23. Vías KEGG enriquecidas derivadas de transcriptos regulados al alza en astrocitos Tg.Viejo. Las vías se organizan según clase KEGG; las vías en naranja pertenecen a las siguientes clases: *Transcription*; *Translation*; *Folding, sorting and degradation*; azul: *Signal transduction*; *Signaling molecules and interaction*; azul pálido: *Organismal Systems* (*Immune system*); púrpura: *Metabolism*; y amarillo: *Human diseases*. Por brevedad, solo se incluyen las vías más representativas dentro de cada grupo. Consulte el Apéndice 1.1.1 (Fig. S9-10, Table S1-2) para ver la lista completa y el análisis de la superposición de vías. *Log10(p-value)* toma el valor *p* mínimo entre los resultados de GAGE, *camera* y *goana*, *Median logFC* considera la mediana del cambio de expresión de todos los genes detectados en la vía, *Median logFC (DEGs)* está restringido a genes expresados diferencialmente (DEGs). El número total de DEGs involucrados en vías reguladas al alza es 803 (567 efectivamente sobre-expresados), con un *logFC* medio de 0.92.

3.3. Alteraciones transcripcionales asociadas con características proinflamatorias y proliferativas

El perfil proinflamatorio y proliferativo de los astrocitos Tg.Old se ilustra en varias alteraciones particulares: regulación al alza del factor de transcripción p65 (Rela, factor nuclear-kappa-B subunidad p65), enzimas proinflamatorias (Ptgs2, Nos2), y citoquinas (Il-33, Ccl11), así como proteínas de la matriz extracelular (cadenas de colágenos, lamininas, integrinas), factores de crecimiento y metaloproteases de matriz. La alteración en Nf-kappaB es destacable por su rol en la neuroinflamación, proliferación y adaptaciones metabólicas asociadas (Onyango et al., 2021; Reuter et al., 2010; Schmitz et al., 2018; Sprenkle et al., 2017). En las figuras 24 y 25 se presentan listas de mediadores inflamatorios, factores de crecimiento y otras proteínas asociadas.

Estas alteraciones muestran el rol dual de los astrocitos en contexto de daño. Ptgs2, Nos2 y Pla2g4a codifican enzimas proinflamatorias que han sido asociadas con reactividad y EA (Ho et al., 2001; Viejo et al., 2021; Yasojima et al., 1999). En particular, Pla2g4a codifica la enzima cPLA2 que participa de la ruta del ácido araquidónico y está asociada con efectos nocivos en ratones (Chao et al., 2019). Asimismo, citoquinas como Cxcl12, Il-34, e Il-33 se asocian con efectos beneficiosos, mientras que Il-6 y Ccl11 podrían tener efectos dañinos (Viejo et al., 2021) (Parajuli et al., 2015; C. Zhu et al., 2016). La enzima Mmp3, también presente en EA (Viejo et al., 2021), puede contribuir a la plasticidad de la sinapsis como a la apoptosis (Hove et al., 2012; E. M. Kim & Hwang, 2011). La regulación al alza de algunos factores de

crecimiento puede tener efector neuroprotectores así como promover la proliferación de astrocitos u otras células (Calvo et al., 2018; W. Chen et al., 2019; Savchenko et al., 2019). Sin embargo, en el caso de Bdnf y Ngf también pueden promover efectos nocivos. Por ejemplo, el desequilibrio de la señalización de Ngf a través de los receptores TrkA y p75NTR se ha asociado con la EA y otros trastornos (Fahnestock & Shekari, 2019; Mysona et al., 2015; Tiveron et al., 2013). En particular, pro-Ngf se ha asociado con efectos proapoptóticos de astrocitos reactivos y otros modelos (Beattie et al., 2002; Cheng et al., 2020; Domeniconi et al., 2007; Marchetti et al., 2019).

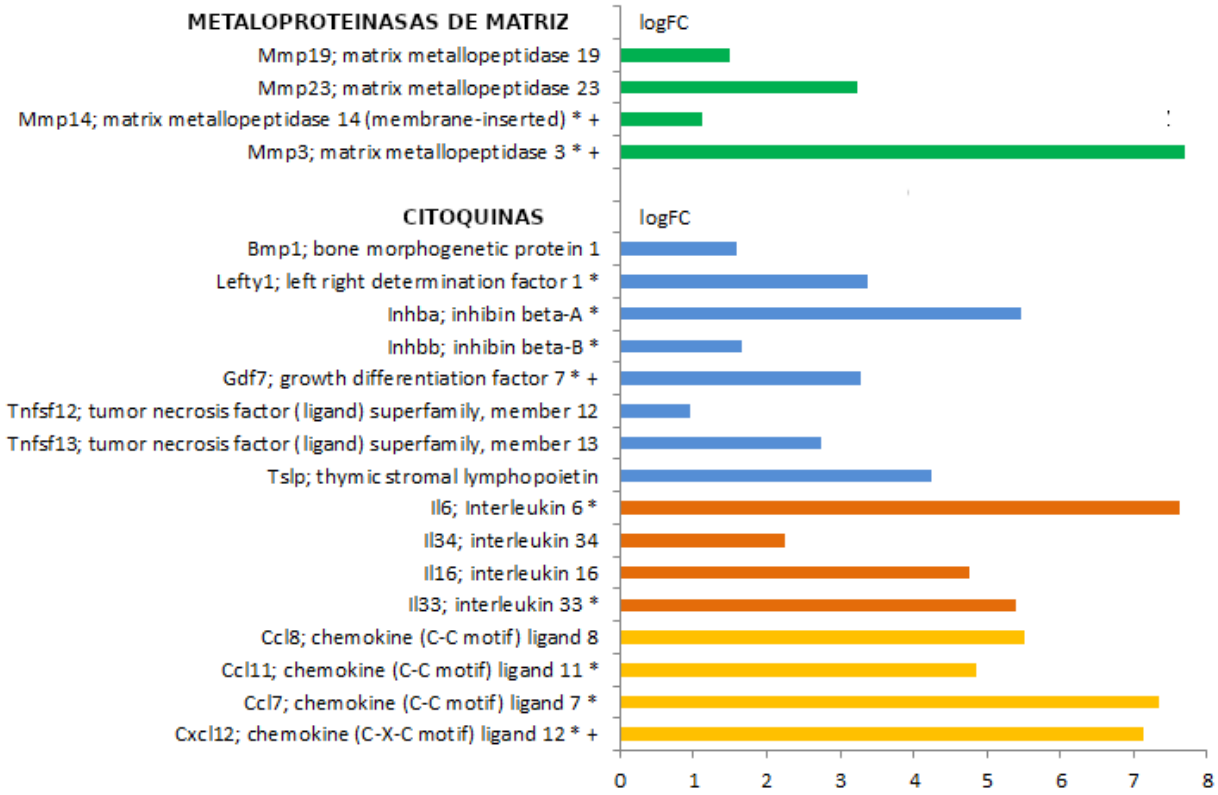


Figura 24. Ejemplos de citoquinas y metaloproteinasas de matriz reguladas al alza. * indica factores presentes en vías KEGG reguladas al alza, + indica factores presentes en vías KEGG reguladas a la baja. Las vías reguladas al alza incluyen "*Pathways in cancer*", "*PI3K-Akt signaling pathway*", "*TNF signaling pathway*" y "*IL-17 signaling pathway*", entre otras. Las vías reguladas a la baja incluyen "*Axon guidance*", "*Calcium signaling pathway*" y "*cAMP signaling pathway*". El valor *q* para la interleucina 6 es 0,0506, considerando su importancia funcional también se incluyó.

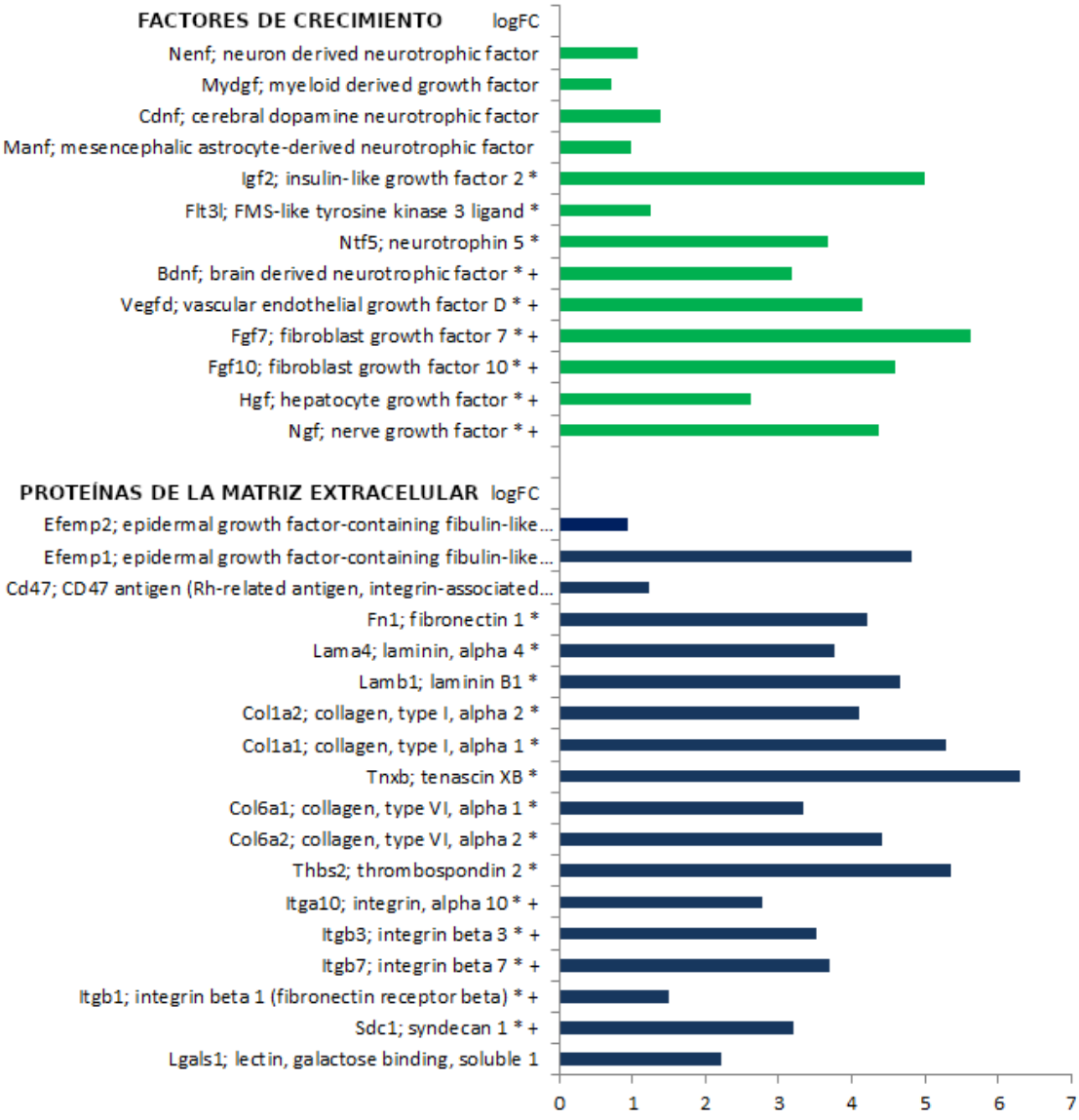


Figura 25. Ejemplos de factores de crecimiento, matriz extracelular y proteínas relacionadas regulados al alza. * indica factores presentes en las vías KEGG reguladas al alza, + indicar factores presentes en las vías KEGG reguladas a la baja. Las vías reguladas al alza incluyen "*Pathways in cáncer*", "*PI3K-Akt signaling pathway*", "*TNF signaling pathway*" y "*IL-17 signaling pathway*", entre otras. Las vías reguladas a la baja incluyen "*Axon guidance*", "*Calcium signaling pathway*" y "*cAMP signaling pathway*".

3.4. Alteraciones transcripcionales asociadas al metabolismo biosintético y energético

Los datos transcriptómicos también sugieren alteraciones en el metabolismo energético de los astrocitos, incluida la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato (*pentose phosphate pathway*, PPP), el ciclo del ácido cítrico, y la fosforilación oxidativa. Se destaca una expresión reducida de dos transcriptos de las subunidades Pfkm y Pfkp de la enzima Pfk1, lo que sugiere una reducción de la glicólisis, así como de Pfkfb3, asociada a un aumento de la vía de la PPP. Otra alteración interesante sugerida es la de la enzima

glutaminasa (Gls) así como de otras enzimas y transportadores del metabolismo anaplerótico (Got1, Got2, Slc1A5) que sugieren un mayor uso de glutamina u otros sustratos, y su conversión a glutamato como fuente de carbono y poder reductor (NADH, FADH2) para la síntesis de ATP (Le et al., 2012; Reitzer et al., 1979; Siegel & Ursini-Siegel, 2021; Z. Song et al., 2022). Estas alteraciones son similares al comportamiento de células malignas, sugieren una adaptación a condiciones de estrés que favorece mecanismos de defensa, crecimiento y reparación celular (Franklin et al., 2016; Stincone et al., 2015; W. Yi et al., 2012). Por ejemplo, el aumento del transportador de cisteína xCT promueve la síntesis de glutatión y liberación de glutamato (J. Liu et al., 2020; Siegel & Ursini-Siegel, 2021; Z. Song et al., 2022).

Si bien los astrocitos son conocidos por su actividad glucolítica que apoya el funcionamiento neuronal, la producción de energía en los mismos se basa en gran medida en el metabolismo oxidativo mitocondrial (Bélanger et al., 2011; Bolaños, 2016; Hertz et al., 2007). Como se mencionó anteriormente los astrocitos Tg.Old presentan alteraciones mitocondriales, particularmente a nivel de los complejos de la cadena respiratoria (figura 26). Se aprecia una reducción a la baja de transcriptos de subunidades accesorias del CI, lo que sugiere una reducción de la actividad de este complejo aunque no puede descartarse un papel compensador de otras subunidades. En el CII se observa una reducción a la baja de dos subunidades catalíticas, Sdha y Sdhb, verificándose esta última a nivel de la proteína. También se evidencia una disminución en la expresión proteica de la subunidad catalítica Atp5a1 del CV, algo que también se ha observado en cáncer (G. Zhang et al., 2021).

Además de su funcionamiento individual, los complejos de la cadena respiratoria pueden ensamblarse en estructuras supramoleculares denominadas supercomplejos, por ejemplo de CI-III-IV (Acín-Pérez et al., 2008; Genova & Lenaz, 2014) (revisado en (Lobo-Jarne et al., 2020)). Si bien su rol fisiológico y mecanismo de funcionamiento aún se discuten (Hirst, 2018), la formación de supercomplejos podría fomentar la respiración al reducir la difusión del citocromo c (sobre expresado en Tg.Old) (Berndtsson et al., 2020; Brave & Becker, 2020; Hollinshead et al., 2020). Alteraciones y tendencias de varios transcriptos pertenecientes a CI (Ndufb4, Ndufb9), CIII (Uqcrh/Qcr6, Uqcrfs1/Rieske) y CIV (Cox7a2l, Cox7a1 y Cox7a2), así como la presencia de un banda adicional de alto peso molecular en el análisis de *western blot* sugieren pueda existir una reorganización de este tipo (Garone et al., 2018; Schägger, 2002).

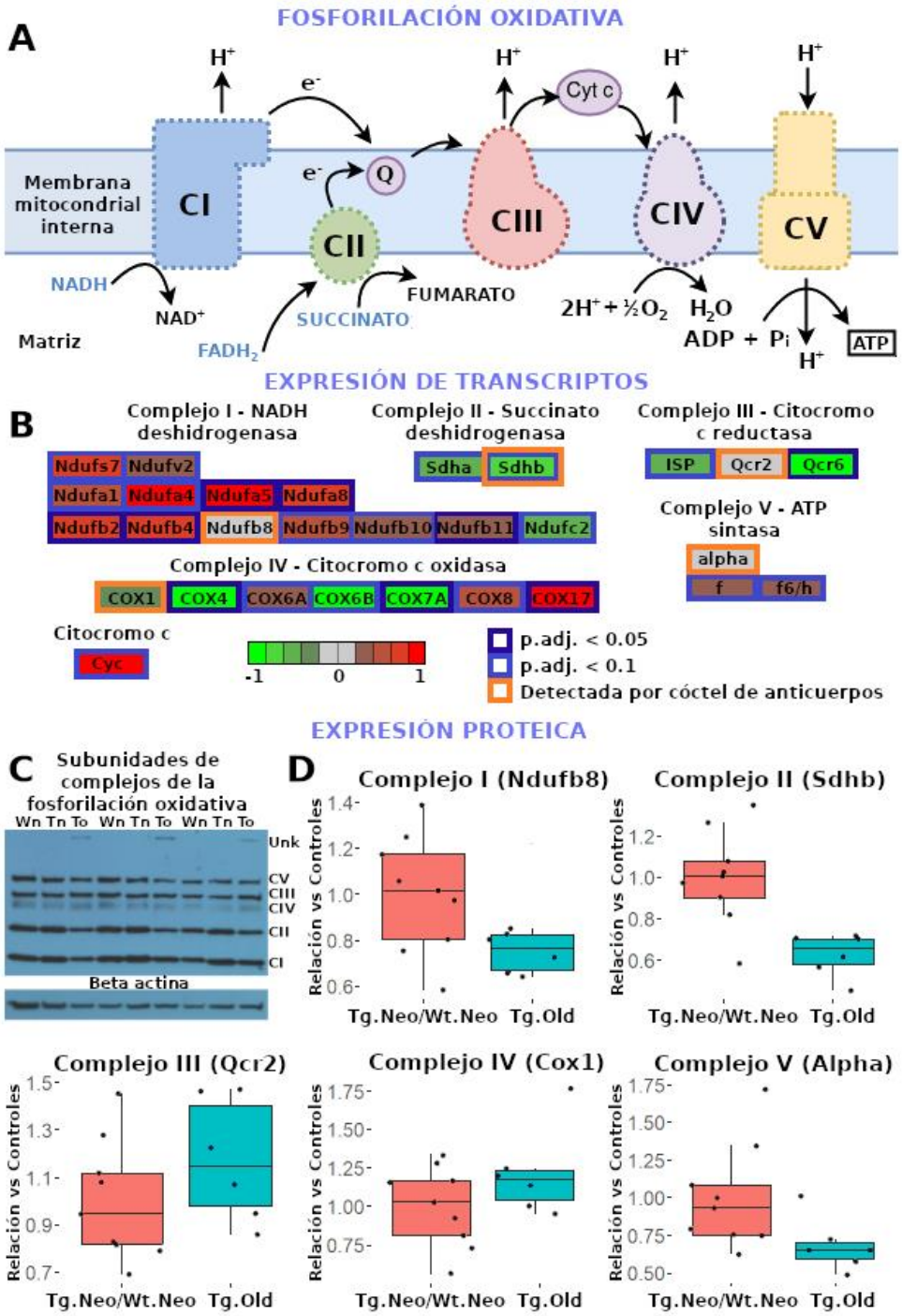


Figura 26. Transcripción y expresión proteica de complejos de la fosforilación oxidativa en astrocitos neurotóxicos. A. Esquema de fosforilación oxidativa (creado con las herramientas *diagrams.net* y *Gimp*). B. Mapa de colores de los transcriptos adaptado de KEGG y Pathview. Para simplificar, solo se representaron las subunidades expresadas diferencialmente con un criterio estricto (p.adj <0,05) e indulgente (p.adj <0,1), así como las subunidades detectadas a nivel de proteína. C. Ejemplo de escaneo de *western blot*. La expresión de proteínas de diferentes subunidades del complejo mitocondrial se evaluó mediante *western blot* utilizando un cóctel de anticuerpos. En astrocitos neurotóxicos se detectó una banda adicional (Unk) de alto peso molecular (~135 kDa). D. Gráficos de

expresión de proteínas individuales. Se siguió un enfoque indulgente para detectar tendencias en la expresión de proteínas: las muestras del grupo Tg.Old (To) se compararon con las muestras de control Tg.Neo (Tn) y Wt.Neo (Wn) unidas como un solo grupo, los valores se normalizaron frente a la expresión de beta actina y adicionalmente por la expresión promedio de los controles de cada ensayo (Ralación vs Controles). Bajo este enfoque se observaron tendencias en la alteración de subunidades de los siguientes complejos: CI (p.adj = 0.07), CII (p.adj = 0.005) y CV (p.adj = 0.04) (test de Wilcoxon).

3.5. *Interacción entre respuestas de estrés y adaptaciones funcionales*

Como se mencionó anteriormente, existe un dialogo entre el ER y la mitocondria. Las respuestas de estrés del ER (figura 27) influyen sobre la función mitocondrial e impactan sobre la glucólisis, el metabolismo de aminoácidos, etc. (Almanza et al., 2019; Bhattarai et al., 2021; Bravo et al., 2012; Gansemer et al., 2020; A. Gill et al., 2002; Gonen et al., 2019; K. T. Liu et al., 2018; Rainbolt et al., 2014; D. Wang et al., 2006; J. Zhang et al., 2020). El estrés del retículo promovería la formación de supercomplejos (Balsa et al., 2019) y se ha asociado con la disfunción mitocondrial presente en células malignas (Tao et al., 2022), durante el envejecimiento (Q. Chen et al., 2020) y en modelos de neurodegeneración (Dafinca et al., 2021; Evinova et al., 2022). El estrés de retículo también puede promover la glucolisis aeróbica al inducir la enzima ERO1l (J. Zhang et al., 2020).

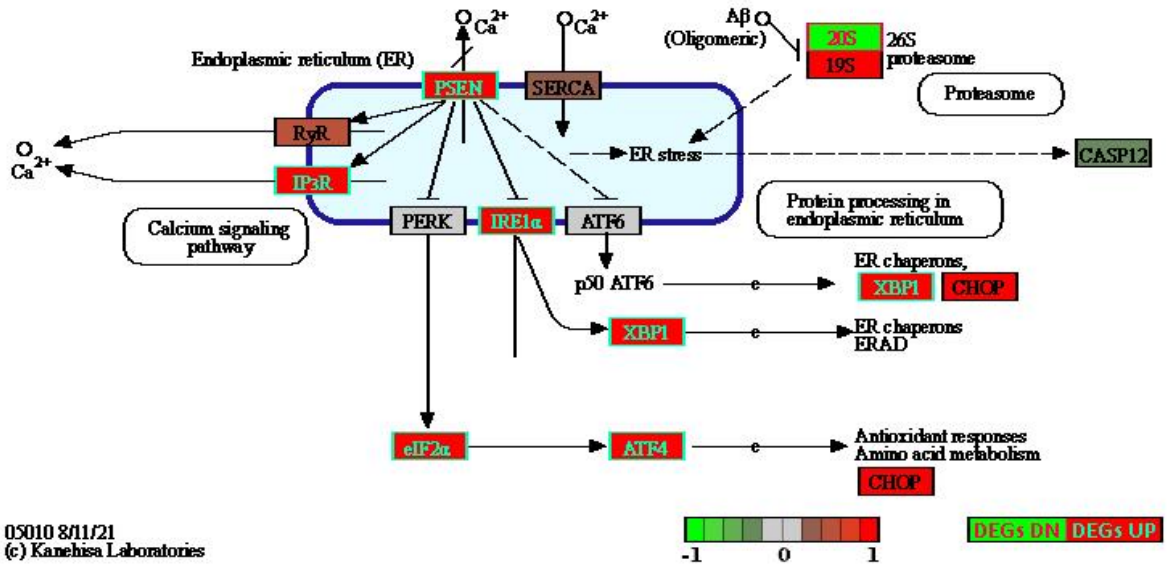


Figura 27. Señalización relacionada con el procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico. Extracto simplificado tomado del mapa de colores KEGG de la "enfermedad de Alzheimer" (mmu05010). Patrón de color expresado según el logFC observado. Los nodos correspondientes a DEGs están remarcados. Ver representación completa en Apéndice 1.1.1.

La convergencia entre procesos inflamatorios, metabólicos y respuestas de estrés de estos organelos puede ocurrir a través de varios factores de transcripción (Ghemrawi et al., 2018; Hotamisligil, 2010; Martin-Jiménez et al., 2017; Salvadó et al., 2015; Schmitz et al., 2018). La interacción entre los distintos actores de varias de las vías de señalización alteradas puede observarse por ejemplo en un diagrama de interacción proteína-proteína, entre otros análisis (figura 28, Apéndice 1.1.1). En particular, la regulación

al alza de los factores de transcripción Hif-1α y c-Myc en astrocitos Tg.Old representa posibles adaptaciones de autoconservación de estas células. En condiciones de estrés, la actividad de Hif-1α puede fomentar la captación de glucosa y regular su flujo a través de las vías glucolítica y de pentosa fosfato, protegiendo las células neuronales y aumentando la supervivencia del cáncer (X. Chen et al., 2014; Lõpez-Hernández et al., 2015; Soucek et al., 2003). Se asocia también a un cambio en la expresión de las isoformas de Ldh, presente en el perfil transcriptómico, y que puede reducir el uso de lactato como sustrato para la respiración mitocondrial y favorecer la glucólisis aeróbica (Papandreou et al., 2006). HIF-1α puede regular la expresión de Cxcl12 asociada con el crecimiento tumoral (De Falco et al., 2004). De manera similar, c-Myc en condiciones de estrés fomenta la proliferación, la glucólisis, la biosíntesis de glutatión a partir de la glutamina y la glutaminólisis (Goetzman & Prochownik, 2018; Hart et al., 2012; Le et al., 2012; D. M. Miller et al., 2012). El factor de transcripción Snail (Snai1) está involucrado en la alteración de Pfkfb3 y el aumento del flujo a través de la PPP (N. H. Kim et al., 2017). Snai1 puede ser inducido por estrés de retículo, asociándose a una respuesta protectora para la célula (Shin et al., 2015; Ulianich et al., 2020).

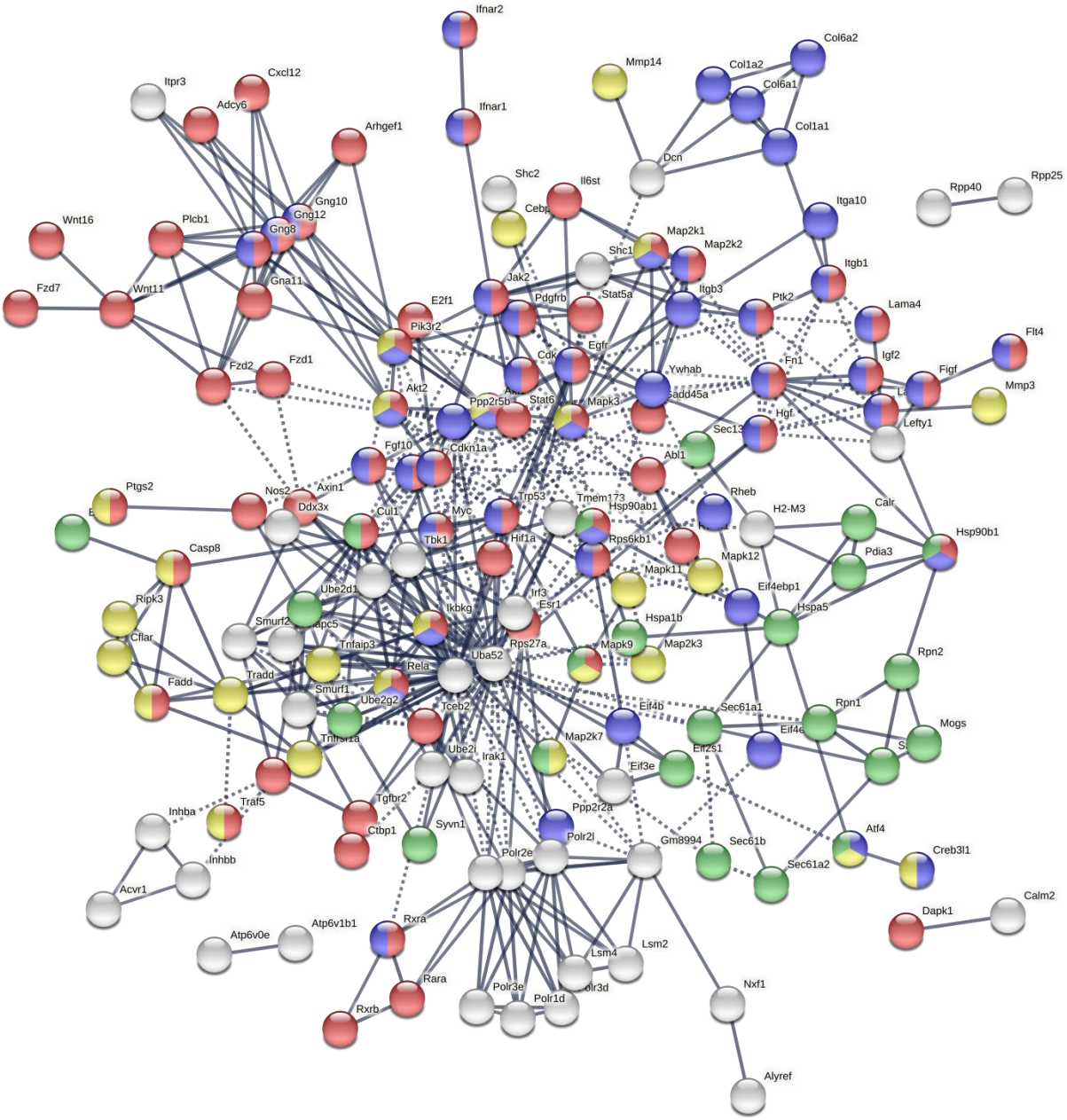


Figura 28. Esquema STRING, red de interacciones de DEGs regulados al alza. Los DEGs regulados al alza se subdividieron si estaban presentes en al menos dos vías KEGG reguladas al alza (164 DEGs). Este es un enfoque de tipo *greedy* para lograr una representación reducida de los DEGs involucrados en vías alteradas. Los bordes de la red representan todas las interacciones con la puntuación de confianza más alta (0,9). Los nodos desconectados están ocultos. Agrupamiento k-means (4 agrupamientos). Código de colores: rojo, DEGs presentes en "*Pathways in cancer*"; azul, DEGs presentes en la "*PI3K-Akt signaling pathway*"; amarillo, DEGs presentes en "*TNF signaling pathways*"; verde, DEGs presentes en "*Protein processing in endoplasmic reticulum*".

En este sentido, aunque no se conocen todos los detalles mecanicistas, estos organelos serían los elementos centrales desde donde se iniciaría el conjunto de alteraciones observadas en los astrocitos. Las respuestas de estrés del ER prolongadas pueden fomentar la muerte celular y la inflamación,

contribuyendo a la progresión de cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas (Duran-Aniotz et al., 2017; Martin-Jiménez et al., 2017; Schmitz et al., 2018). Varias evidencias sugieren una asociación entre estrés del retículo en astrocitos, alteraciones proinflamatorias y efectos nocivos que pueden contribuir a la neurodegeneración (de la Monte et al., 2012; Gu et al., 2013; Martin-Jiménez et al., 2017; Prasad et al., 2008; H. L. Smith et al., 2020).

3.5.1. Rasgos senescentes en astrocitos Tg.Old

Si bien los astrocitos Tg.Old continúan siendo células proliferantes, las alteraciones descriptas podrían enmarcarse en un proceso más general de senescencia. La senescencia celular se asocia a un fenotipo secretor proinflamatorio (SASP) (Kritsilis et al., 2018; X. Zhu et al., 2021), alteraciones metabólicas (Correia-Melo et al., 2016; Kritsilis et al., 2018; B. Y. Lee et al., 2006; Weichhart, 2018; M. Wu et al., 2017) y estrés de retículo (Cormenier et al., 2018). Se ha propuesto sea un factor contribuyente tanto al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como a procesos cancerígenos (Carreno et al., 2021). El perfil transcriptómico sugiere varias alteraciones concordantes con senescencia, desde alteraciones comunes con reactividad (figura 29) (Gfap, Il6, Kcnj10, Igbp4, Igfbp46, Txndc5, Bgn, Plat) hasta aquellas presentes en células malignas (Npm1, Flnc, Loxl2) (Holmberg Olausson et al., 2015; Kamil et al., 2019; Q. Zhang et al., 2020). Algunos de estos transcriptos podrían estar asociados a efectos nocivos de los astrocitos, como el de la enzima proinflamatoria Plat (Adhami et al., 2008; J. Li et al., 2013). La relación entre procesos de estrés celular, la astrogliosis y la senescencia así como su contribución al desarrollo de la EA, los trastornos metabólicos y otras patologías como el cáncer son líneas de investigación relevantes para futuros estudios.

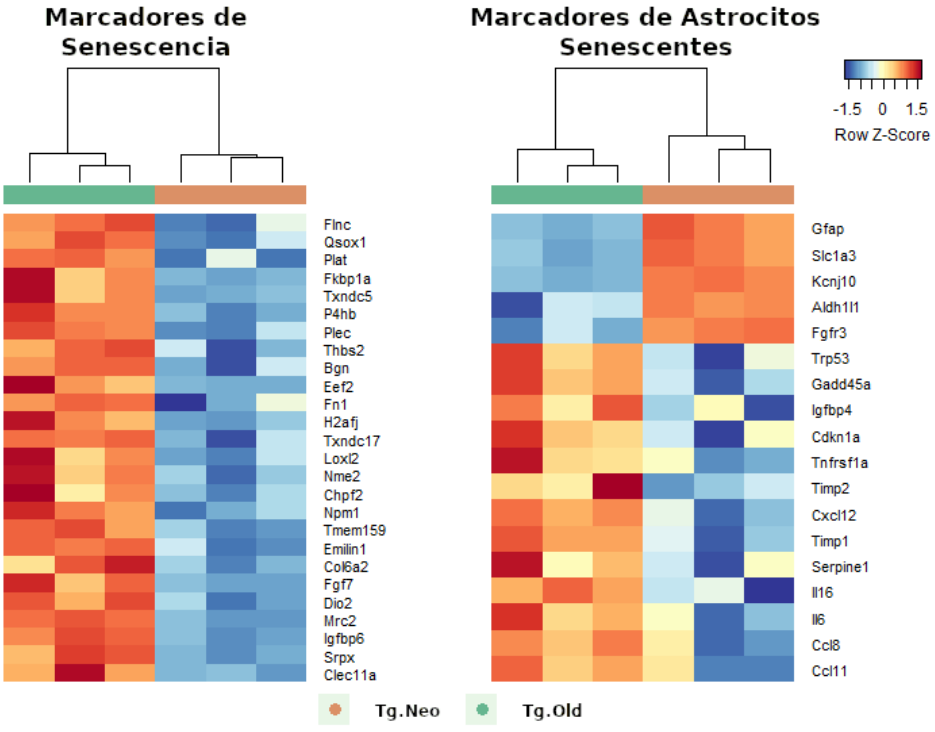


Figura 29. Marcadores de senescencia en astrocitos neurotóxicos 3xTg-AD. Los marcadores se agruparon en marcadores generales de senescencia (izquierda) y marcadores identificados específicamente en astrocitos (derecha). Para los marcadores de senescencia generales, solo se consideró un subconjunto de DEGs sobre-expresados (logFC> 1, p.adj <0.01). Los marcadores observados en los astrocitos también incluyen marcadores "negativos" (que se espera que estén regulados a la baja), que comprenden el primer grupo regulado a la baja. Dada su importancia, también se incluyó Il-6 (p.adj = 0,0506). Marcadores y proteínas relacionadas fueron recopiladas de fuentes bibliográficas (Basisty, Kale, Jeon, et al., 2020; Basisty, Kale, Patel, et al., 2020; Bhat et al., 2012; Casella et al., 2019; E. P. Crowe et al., 2016; González-Gualda et al., 2021) (ver lista completa y referencias en Apéndice 1.1.2).

V. CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA

En este capítulo nos centramos en la caracterización metabolómica de los astrocitos Tg.Old. Este enfoque nos permite aportar nuevas evidencias sobre ¿Qué metabolitos se expresan diferencialmente? ¿Qué alteraciones funcionales pueden estar implicadas en su fenotipo neurotóxico? ¿Son estas alteraciones consistentes con las evidencias de transcriptómica? ¿A qué otros tipos de células se asemejan los astrocitos Tg.Old?

A continuación, detallamos los fundamentos de esta herramienta ómica, seguido de una breve reseña de la estrategia experimental utilizada, y finalmente la presentación y discusión de los resultados obtenidos. Estos forman parte de un manuscrito preparado para su publicación en una revistra arbitrada. El mismo se agrega adjunto en el Apéndice 2 de esta tesis. En ese material pueden encontrarse mayores detalles de metodología, resultados y ejemplos asociados.

1. Fundamentos de metabolómica

En su ideal las estrategias "ómicas" aspiran al estudio de la totalidad de las biomoléculas de un organismo. De esta forma se han desarrollado múltiples áreas como la genómica, la transcriptómica y la proteómica, cada una contemplando un aspecto del fenotipo molecular de un organismo. La metabolómica es el análisis del conjunto completo de metabolitos, o metaboloma, en un organismo, como aminoácidos, lípidos, ácidos orgánicos o nucleótidos (Patti et al., 2012). El metaboloma es un elemento esencial de la función celular, producido por reacciones químicas, que serían más sensibles a las perturbaciones genéticas y ambientales que el transcriptoma y el proteoma (Gebregiworgis & Powers, 2012; Kell et al., 2005; Kuile & Westerhoff, 2001). Su estudio ayuda a comprender procesos fisiológicos y patológicos, pudiendo fomentar la identificación de nuevas estrategias terapéuticas y diagnósticas (Guodong Chen & Pramanik, 2009; Issaq et al., 2009; Putri et al., 2013). Entre los numerosos ejemplos se encuentran aplicaciones en la investigación del cáncer (J. L. Griffin & Shockcor, 2004), enfermedades cardiovasculares (J. L. Griffin et al., 2011), enfermedades del sistema nervioso central (Kaddurah-Daouk & Krishnan, 2008), diabetes (Wang-Sattler et al., 2012) y la fibrosis quística (Wetmore et al., 2010). Además, las estrategias de metabolómica se han utilizado con éxito en otras áreas como en la nutrición, y la investigación ambiental, entre otros temas (Bundy et al., 2008; Putri et al., 2013).

Los estudios metabólicos generalmente se dividen en dos modos complementarios: dirigidos y no dirigidos (Gertsman & Barshop, 2018; Roberts et al., 2012). Los análisis dirigidos se centran en un conjunto predefinido de metabolitos, como sustratos de una enzima, una clase particular de compuesto o miembros de una ruta particular. Dado que las propiedades químicas de los compuestos investigados son conocidas, la preparación de la muestra se puede particularizar. En este sentido, la lipidómica constituiría un área importante de la metabolómica dirigida (ver definición de (J. H. Wang et al., 2010)). Los análisis no dirigidos, por otro lado, tienen como objetivo detectar tantos metabolitos como sea posible a partir de muestras biológicas sin introducir *a priori* ningún sesgo.

1.1. Plataformas analíticas

Los estudios metabolómicos han mejorado significativamente gracias a numerosos avances tecnológicos y computacionales que permiten una cobertura más completa del metaboloma (Ivanisevic et al., 2013; Soltow et al., 2013; Sud et al., 2016; Uppal et al., 2013). Las plataformas de detección de metabolitos se basan principalmente en espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN).

MS es actualmente la técnica más utilizada, pudiendo detectar metabolitos a baja concentración (del orden de pico y nanomolar) (Dettmer et al., 2007). Los espectrómetros de masas modernos de alta resolución incluyen "tiempo de vuelo" (*time of-flight*, TOF), "trampa de iones" (*ion trap*, IT), "trampa de iones orbital" (*Orbitrap*), ciclotrón de iones por transformada de Fourier (*Fourier transform ion cyclotron*, FTICR) y cuadrupolo. Un espectrómetro de masas se compone normalmente de tres partes principales: fuente de iones, analizador de masas y detector. Mientras que la fuente de iones convierte las moléculas de la muestra en iones, el analizador de masas resuelve estos iones en un tubo de tiempo de vuelo o en un campo electromagnético antes de que el detector los mida. Pueden proporcionar mediciones de masa precisas que facilitan la identificación de metabolitos así como una cuantificación precisa de los mismos. Disposiciones más complejas de detectores pueden mejorar a la identificación de metabolitos mediante la adquisición de espectros de fragmentación (MS/MS).

Para maximizar la cobertura del metaboloma, una muestra biológica puede analizarse en modos de ionización positivo y negativo en un rango de exploración de alrededor de m/z 50–1000. La MS siempre está acoplada a técnicas de separación, como la cromatografía líquida MS (LC-MS) y la cromatografía de gases MS (GC-MS), lo que reduce los efectos de matriz de las muestras biológicas y reduce la complejidad de los analitos en el momento de la detección. LC-MS, generalmente acoplado a cromatografía liquida de alto (HPLC) o ultra alto rendimiento (UPLC) (presión >400 bar, partículas de columna <2 µm de diámetro), puede separar y detectar en poco tiempo y con alta sensibilidad una amplia gama de moléculas (Theodoridis et al., 2012; Wolfender et al., 2015). Se han desarrollado muchos tipos de columnas LC para analitos hidrofílicos e hidrofóbicos. La cromatografía líquida de fase inversa (RPLC), que normalmente utiliza columnas C18, puede separar compuestos semipolares como ácidos fenólicos, flavonoides, esteroides glicosilados, alcaloides y otras especies glicosiladas. La cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) puede utilizar columnas, como columnas de aminopropilo, para separar compuestos polares como azúcares, aminoazúcares, aminoácidos, vitaminas, ácidos carboxílicos y nucleótidos, etc. (Hemström & Irgum, 2006).

LS-MS generalmente usa ionización por electropulverización (electrospray ionization, ESI) como fuente de iones, una "ionización suave" que a menudo forma iones moleculares intactos lo que ayudan a la identificación de los mismos, aunque también es propensa a efectos de la matriz como la supresión de iones. Los procedimientos de preparación de muestras para LC-MS utilizan con frecuencia mezclas de disolventes orgánicos fríos, como acetonitrilo/agua o metanol/agua, para "apagar" (*quenching*) el metabolismo celular, precipitar proteínas y extraer metabolitos, mejorando la cobertura y la reproducibilidad (Raterink et al., 2013; Sapcariu et al., 2014; H. Wu et al., 2008).

Alternativamente la MS acoplada a cromatografía de gases, GC-MS, se puede utilizar para el análisis de metabolitos volátiles y de metabolitos primarios luego de su derivatización. Esta es muy sensible,

cuantitativa y reproducible, y suele detectar en el orden de mil metabolitos en una muestra (Wolfender et al., 2015). La GC-MS suele utilizar la ionización por impacto de electrones (EI), que es menos propensa a los efectos de la matriz de la muestra, ioniza la mayoría de los compuestos con una eficacia relativamente alta y genera espectros de masas independientes del instrumento (dentro del mismo tipo de espectrómetro de masas) compatibles con la creación de bibliotecas. La GC-MS no es adecuada para el análisis de compuestos grandes o termolábiles, como lípidos intactos no polares, nucleótidos, nucleótidos difosfatos, cofactores u oligosacáridos.

La RMN se puede utilizar para identificar y cuantificar metabolitos de mezclas complejas. La espectroscopia de RMN se basa en el hecho de que ciertos núcleos atómicos poseen un espín magnético, comúnmente protones (1H RMN), y cuando se colocan dentro de un campo magnético pueden adoptar diferentes niveles de energía detectables usando ondas de radiofrecuencia (Gebregiworgis & Powers, 2012; Smolinska et al., 2012; Wolfender et al., 2015). El procesamiento de muestras no requiere derivatización química, y no es destructivo ya que la muestra no entra en contacto con el detector. Tiene una sensibilidad y un rendimiento más bajos que otras técnicas ya que detecta en el orden de docenas de metabolitos.

1.2. Extracción y preprocesamiento de datos

La extracción y preprocesamiento de datos tiene lugar después de recopilar los espectros crudos y es un paso necesario para extraer información sobre los metabolitos. Para los experimentos de LC-MS, los espectros crudos contienen millones de puntos de datos por perfil, consistentes en un triplete de valor m/z, tiempo de retención e intensidad (figura 30). Los pasos clave del preprocesamiento de los datos crudos de LC-MS incluyen la detección de picos (junto a la reducción y cuantificación del ruido), alineación de picos y corrección del tiempo de retención, y finalmente recuperación de señales débiles (Boccard et al., 2010; Castillo et al., 2011; Katajamaa & Orešič, 2007).

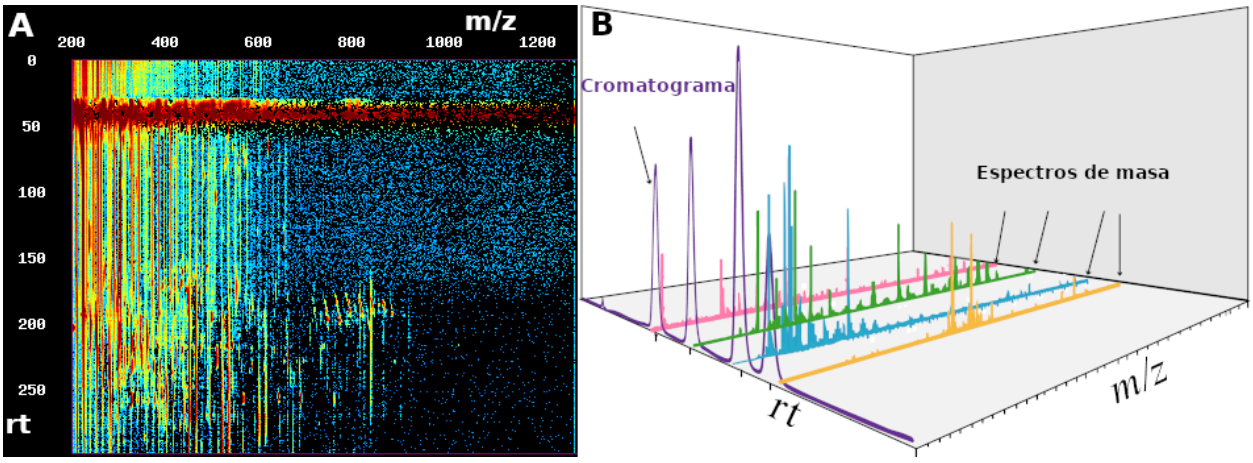


Figura 30. A. Representación bi-dimensional de un espectro de LC-MS. B. Esquema tridimensional de un espectro de LC-MS. rt: tiempo de retención; m/z: masa carga.

La detección de picos es una transformación que convierte los datos crudos continuos en datos discretos, generalmente realizada calculando primero los centroides de los picos en el rango m/z y luego

buscando picos cromatográficos en el rango de tiempo de retención. La "partición" del espectro (*binning* o *bucketing*) es una estrategia común (figura 31). Divide los espectros en segmentos, también llamados cromatogramas de iones extraídos (*extracted ion chromatograms*, EIC), y reemplaza los valores dentro de cada contenedor por un valor representativo. Algunos problemas pueden surgir por este procesamiento, como la división artificial de una posible entidad química o *feature* y la fusión de dos *features* con m/z muy cercano (Åberg et al., 2008; C. A. Smith et al., 2006). Los métodos adaptativos como el gaussiano y la transformada *wavelet* mejoran parcialmente esta limitación (P. E. Anderson et al., 2008; R. A. Davis et al., 2007; Tautenhahn et al., 2008). La alineación corrige las desviaciones del tiempo de retención y las diferencias de masa entre las muestras para que una *feature* esté representada por la misma masa y tiempo de retención en todas las muestras. La detección de picos y la alineación dan como resultado una tabla de datos que proporciona las *features* detectadas en las muestras.

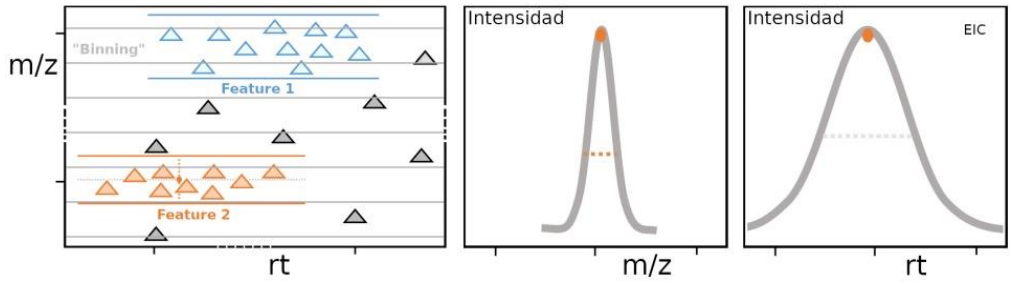


Figura 31. Representación de la estrategia de particionado ("binning") de espectros de LC-MS. Previo a la detección de picos comúnmente los espectros pueden ser "particionados". La intensidad de una partición correspondiente a una posible *feature* puede observarse en la dimensión del tiempo de retención (rt) como un EIC (*extracted-ion chromatogram*) o de la masa/carga (mz). Adaptado de (Feng et al., 2021).

Muchos programas de acceso libre o por proveedores se han desarrollado para estas tareas, incluidos XCMS, *MZmine 2*, MS-DIAL, etc. (Theodoridis et al., 2012). XCMS es un paquete ampliamente utilizado, implementa una estrategia particular para la detección simultánea de *features* y la eliminación de ruido (*second derivative Gaussian matched filter*). Su algoritmo de corrección del tiempo de retención calcula un perfil de desviación no lineal para cada muestra utilizando *features* de referencia identificadas dinámicamente. Métodos más recientes han introducido otras mejoras. El paquete *apLCMS* emplea un procedimiento adaptativo para seleccionar y refinar *features* evitando cortes duros asociados con las estrategias típicas de *binning* (Yu et al., 2009; Yu & Peng, 2010). Sus características principales incluyen: (1) uso de estadísticas no paramétricas para el *binning* adaptativo, búsqueda automática de márgenes de tolerancia en m/z y tiempo de retención (*fine-tune intensity grouping*), (2) uso de un filtro dinámico la reducción de ruido (*run filter*), (4) modelado de picos asimétricos utilizando un modelo mixto bi-gaussiano, (5) de-convolución del tiempo de retención basada en inferencia de picos que comparten el valor m/z, (6) detección "híbrida" de *features*, utiliza tanto la detección de *features de novo* como la información de *features* detectadas previamente (proporcionada por el usuario) (Yu et al., 2013), y (7) computación paralela.

xMSanalyzer, es otro paquete *R* que introduce varias utilidades para mejorar la detección de picos basándose en métodos existentes como *apLCMS* y XCMS (Uppal et al., 2013). Las utilidades de

xMSanalyzer realizan las siguientes actividades: 1) detección de *features*, incrementa la cantidad de *features* reproducibles procesando muestras en dos o más configuraciones de parámetros diferentes, los datos son luego fusionados y filtrados según su consistencia, 2) control de calidad de los datos, 3) superposición de *features* entre múltiples conjuntos de datos o paquetes de software y 4) anotación de metabolitos en bases de datos como *Metlin*, KEGG, HMDB, LIPID MAPS, *PubChem*.

1.3. Pretratamiento de datos: normalización e imputación de valores perdidos

La normalización se utiliza para corregir la variación sistemática encontrada entre y/o dentro de las muestras. De esta manera se logra que hacer que las muestras o las *features* sean más comparables, que la estructura de datos se ajuste a los análisis estadísticos o ambas cosas. Las fuentes de variación pueden ser biológicas o técnicas. Una fuente de variación biológica presente en los datos de metabolómica son las diferencias en órdenes de magnitud entre las concentraciones de metabolitos medidas; por ejemplo, la concentración promedio de una molécula de señal es mucho más baja que la concentración promedio de otros compuestos como el ATP. Sin embargo, desde un punto de vista biológico, los metabolitos presentes en altas concentraciones no son necesariamente más importantes que los presentes en bajas concentraciones. Una forma típica de variación técnica son los factores de dilución. Además, los datos ómicos también pueden mostrar heteroscedasticidad, el hecho de que la desviación estándar depende del valor promedio de la medición (Keller et al., 1992; Kvalheim et al., 1994).

Se pueden reconocer tres clases de métodos de normalización: centrado, escalado y transformaciones (R. A. van den Berg et al., 2006). El centrado convierte todas las medidas en fluctuaciones alrededor de cero en lugar de alrededor de la media. Es decir, elimina el corrimiento entre metabolitos de abundancia alta y baja, dejando solo la variación entre las muestras para el análisis (R. A. van den Berg et al., 2006). El centrado se aplica en combinación con otros métodos de normalización. Los métodos de escalado dividen cada variable por un factor de escala correspondiente. El factor de escala puede ser una medida de dispersión (como la desviación estándar) o una medida de tamaño (por ejemplo, la media). El ajuste de escala automático (escala unitaria o unidad de varianza), por ejemplo, se aplica comúnmente y utiliza la desviación estándar como factor de escala. Después del autoescalado, todos los metabolitos tienen una desviación estándar de uno y, por lo tanto, los datos se analizan sobre la base de correlaciones en lugar de covarianzas, como es el caso del centrado. Otros ejemplos incluyen la escala de Pareto, la escala de rango y la escala amplia (*vast scaling*). La escala de nivel convierte los cambios en las concentraciones de metabolitos en cambios relativos a la concentración promedio del metabolito utilizando la concentración media como factor de escala. Los valores resultantes son cambios en porcentajes en comparación con la concentración media. Como una alternativa más robusta se puede utilizar la mediana.

Según se describe en la literatura, las transformaciones incluyen al menos dos conjuntos de métodos. En el primer caso, se puede aplicar una transformación de datos para corregir la heterocedasticidad, convertir relaciones multiplicativas en relaciones aditivas y hacer distribuciones sesgadas (más) simétricas. Estas son conversiones no lineales de los datos como, por ejemplo, la transformación

logarítmica y la transformación de potencia (Kvalheim et al., 1994). Dado que la transformación logarítmica y la transformación de potencia reducen relativamente más los valores grandes del conjunto de datos que los valores pequeños, las transformaciones tienen un efecto de pseudoescala a medida que se reducen las diferencias entre los valores grandes y pequeños de los datos. Sin embargo, el efecto de pseudoescala no está determinado por la multiplicación con un factor de escala como sucede en un escalado convencional. Un inconveniente de la transformación logarítmica es que no puede manejar el valor cero: la transformación logarítmica se aproxima a menos (-) infinito cuando el valor a transformar se aproxima a cero, lo que puede enfatizar las desviaciones en los metabolitos con una concentración relativamente baja.

Otro conjunto de transformaciones son las técnicas de normalización de muestras múltiples que transforman los datos originales para eliminar la variación técnica. La variación técnica surge de cambios en las condiciones experimentales que son difíciles o imposibles de controlar y confundirlas con la variabilidad biológica puede conducir a falsos descubrimientos (Auer & Doerge, 2010). Una de las primeras formas desarrolladas para normalizar los datos ómicos fue mediante el uso de los llamados genes constitutivos (*housekeeping*) (Butte et al., 2001). Esto se intentó con datos de microarray, pero no funcionó bien en la práctica (Eisenberg & Levanon, 2003, 2013). Alternativamente, se desarrollaron o implementaron enfoques basados los datos como la transformación estabilizadora de la varianza (variance-stabilizing transformation, vst) (Durbin et al., 2002), regresión lineal ponderada localmente (*loess*) (Y. H. Yang et al., 2002), métodos basados en *spline* (Workman et al., 2002), y cuantil (*quantile*). La suposición general de estos enfoques es que la variabilidad observada en las propiedades globales de los datos se debe únicamente a razones técnicas y no está relacionada con la biología. Estos también se denominan métodos de datos completos, ya que combinan información de todos los arreglos (*arrays*) para obtener una relación de normalización (Bolstad et al., 2003). La normalización por cuantiles es un método de ajuste global que supone que la distribución estadística de cada muestra es la misma. Originalmente se desarrolló para *microarrays* de expresión génica (Bolstad et al., 2003), pero hoy en día se aplica en una amplia gama de tipos de datos, incluidas matrices de genotipado (Scharpf et al., 2011), secuenciación de ARN (*RNA-Seq*) (Zyprych-Walczak et al., 2015), proteómica (Välikangas et al., 2018), metilación del ADN (Yousefi et al., 2013), secuenciación de ChIP (Kasowski et al., 2010) e imágenes cerebrales (Shinohara et al., 2014). Existen varios procedimientos para realizar la normalización de cuantiles (Yaxing Zhao et al., 2020). La fundamental consiste en clasificar primero el gen de cada muestra por magnitud, calcular el valor promedio de los genes que ocupan el mismo rango y luego sustituir los valores de todos los genes que ocupan ese rango particular con este valor promedio. El siguiente paso es reordenar los genes de cada muestra en su orden original. Este método ha funcionado muy bien en la práctica, pero debe tenerse en cuenta que cuando no se cumplen los supuestos, los cambios globales en la distribución que pueden ser de interés biológico podrían perderse e incluso podrían inducirse señales de forma artificial (Lovén et al., 2012; D. Wang et al., 2011).

Un desafío adicional en los estudios de metabolómica es ocurrencia de valores faltantes (Hrydziuszko & Viant, 2011). Una *feature* podría estar ausente en parte del conjunto de datos debido a defectos en la detección (supresión de iones, baja abundancia), al procedimiento de detección de picos o simplemente por no estar presente en algunas muestras (Hrydziuszko & Viant, 2011). Se han propuesto diferentes

criterios y métodos para tratar los valores perdidos, como la imputación por cero, por una fracción del valor más bajo detectado de la matriz o de acuerdo a algoritmos más sofisticados como el de k-vecinos más cercanos (*k-nearest neighbors*, *kNN*) (Troyanskaya et al., 2001), *singular value decomposition* (SVD) (Stacklies et al., 2007), o *random forest* (RF) (Stekhoven & Bühlmann, 2012). El método seleccionado para manejar los valores faltantes afecta la estructura de datos y el análisis estadístico posterior (Armitage et al., 2015).

1.4. Análisis estadísticos

Los datos de metabolómica también requieren herramientas robustas para revelar su estructura y características metabólicas alteradas (Issaq et al., 2009; Shulaev, 2006). Como se mencionó anteriormente, estas herramientas pueden categorizarse como métodos univariados o multivariados. Asimismo, los métodos multivariados pueden categorizarse como supervisados, aquellos que consideran explícitamente la pertenencia a una clase muestral, o no supervisados. Al igual que en transcriptómica, se recurre a métodos no supervisados para evaluar la estructura general de los datos (PCA), y métodos supervisados para la selección de *features*.

Los métodos univariados utilizados en los análisis metabólicos incluyen la prueba t, análisis por *fold-change*, la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de LIMMA (M. E. Ritchie et al., 2015; Vinaixa et al., 2012) Se utilizan para seleccionar las features discriminante mediantes criterios de valor-p y valor-q (tasa de falsos descubrimientos, falsos positivos). En estudios metabolómicos también es común el empleo de métodos multivariados supervisados para la selección de *features.* Estos incluyen estrategias denominadas de "aprendizaje automático" como PLS (*partial least squares projection to latent structures*) y SVM (*support vector machine*) (Saeys et al., 2007) basadas en otras métricas de selección. PLS-DA (*partial least square-discriminant analysis*) (Barker & Rayens, 2003) es una técnica supervisada multivariada comúnmente utilizada junto con sus extensiones como PLS-DA multinivel (MPLS-DA) (Van Velzen et al., 2008) y PLS-DA ortogonal (OPLS-DA) (Trygg & Wold, 2002). De manera similar a PCA, PLS-DA proyecta los datos (*X*) en un espacio de baja dimensionalidad, pero busca explícitamente la dirección de proyección que brinda la mayor covarianza entre los datos y las etiquetas (pertenencia a un grupo) (*Y*). Las dimensiones que maximizan la separación entre diferentes grupos de datos se denominan variables latentes y se clasifican según lo bien que explican la varianza Y. Luego, a partir de un modelo PLS-DA se pueden encontrar metabolitos discriminantes (C. Chen et al., 2009). Sin embargo, los resultados de las técnicas supervisadas pueden ser engañosos debido a un ajuste excesivo de los datos, por ejemplo al magnificar señales espurias. Debido a esto se recurren a validaciones cruzadas o pruebas de permutación (Bijlsma et al., 2005) para asegurar que los modelos construidos puedan generalizarse.

Los métodos descritos se han implementado en muchos programas y plataformas en línea como *Metaboanalyst* y *xmsPANDA* (*https://github.com/kuppal2/xmsPANDA*). Este último programa es un paquete R para el descubrimiento de biomarcadores, que emplea aprendizaje supervisado y no supervisado y análisis de redes. Realiza el preprocesamiento de datos, incluido el filtrado, la transformación y la normalización, así como estadísticas multidimensionales como PCA, *clustering*, regresión y selección de variables como ANOVA.

1.5. Anotación

En un flujo de trabajo de LC-MS, por ejemplo, luego de que las moléculas ionizadas se escanean en el espectrómetro y los picos espectrales se extraen, cuantifican y alinean en una tabla de *features*, cada *feature* se identifica por una relación masa-carga (m/z) y tiempo de retención cromatográfico, aunque su identidad química aún no se conoce.

En la actualidad, la *identificación* de metabolitos en un estudio metabolómico no dirigido se logra principalmente a través de una anotación tentativa seguida de una verificación experimental. La *anotación* de metabolitos recurre a la coincidencia con propiedades conocidas del mismo, generalmente la relación m/z, u otras similitudes espectrales o propiedades fisicoquímicas sin recurrir a estándares auténticos (Broeckling et al., 2014; Daly et al., 2014; Kuhl et al., 2012; Silva et al., 2014). Se utilizan entonces bases de datos que contienen diversa información, desde espectros de RMN y EM (*electromagnetic*) hasta vías metabólicas, concentración de metabolitos, ubicación anatómica y trastornos relacionados. Entre las bases de datos más usadas se encuentran *Human Metabolome Database* (HMDB) (D. S. Wishart et al., 2009, 2013), *MassBank*, *Metlin* (C. A. Smith et al., 2005), *Lipid Metabolites and Pathways Strategy* (LIPID MAPS) (Fahy et al., 2007), *Madison Metabolomics Consortium Database* (MMCD) (Cui et al., 2008) y KEGG (M Kanehisa & Goto, 2000) (revisado en (E. P. Go, 2009)). El objetivo de HMDB es identificar todos los metabolitos en el ser humano. Contiene información detallada (datos químicos, clínicos y de biología/bioquímica molecular) sobre al menos 40 000 entradas de metabolitos (D. S. Wishart et al., 2013). METLIN es un depósito de más de 75 mil metabolitos endógenos y exógenos presentes en bacterias, plantas y animales, etc. (C. A. Smith et al., 2005). LIPID MAPS es un repositorio específico datos moleculares y biológicos de lípidos (Fahy et al., 2007). La base MMCD es un base de información metabolómica basada en RMN y la EM (Cui et al., 2008). Finalmente, KEGG contiene información sobre rutas metabólicas (M Kanehisa & Goto, 2000), siendo de amplio uso la interpretación sistémica de este tipo de datos.

Aunque las búsquedas basadas en la masa son el método principal para la anotación de metabolitos en LC-MS, esta tiene limitaciones fundamentales. Aparte de la falta de cobertura del metaboloma que hace que la mayoría de las características no estén anotadas, la coincidencia en la masa de los metabolitos rara vez puede ofrecer una anotación única para los iones de interés. Incluso una precisión muy alta de 1 ppm, todavía no es suficiente para la identificación inequívoca de metabolitos debido a la presencia de compuestos con pesos moleculares extremadamente similares (Kind & Fiehn, 2006, 2007; Uppal et al., 2013). Esto es inevitable, por ejemplo, cuando se trata de isómeros, ya que comparten la misma composición elemental.

Otra consideración importante es que la identificación y cuantificación de una *feature* en LC-MS no necesariamente se traduce en un metabolito. En la metabolómica basada en LC-MS, un metabolito suele estar representado por múltiples *features* con distintos valores de m/z pero con tiempos de retención similares, debido a la presencia de isótopos, aductos y fragmentos de pérdida neutra (*neutral loss*) (M. Brown et al., 2009). Por ejemplo, un metabolito detectado como [M+H]+ en la ionización en modo positivo también podría aparecer como los siguientes aductos: [M+Na]+, [M+K]+, [M+NH4]+, etc. Los isótopos que ocurren naturalmente son otro ejemplo, en su mayoría son resultado de la concentración

relativamente alta de 13C que genera un corrimiento de la masa. La mayoría de estas características se pueden identificar agrupando perfiles de elución similares, usando por ejemplo la correlación de intensidad y criterios de diferencia de m/z entre iones (figura 32).

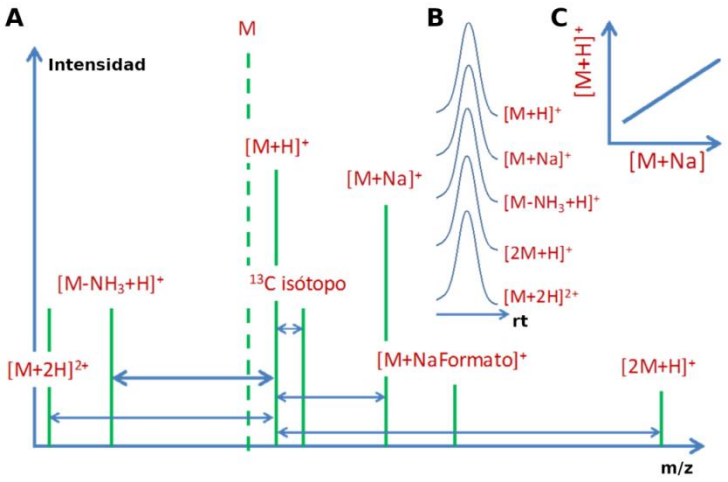


Figura 32. Representación del uso de datos de masa precisos en la anotación de metabolitos. Señales diferentes para el mismo metabolito (aductos, isótopos, etc.) se observan con diferencias de m/z específicas (A), tienen el mismo tiempo de retención y forma de pico (B), y las intensidades para pares de señales están correlacionadas positivamente (C). Adaptado de (Nash & Dunn, 2019).

En este sentido, se han desarrollado varios enfoques computacionales para la anotación de metabolitos que utilizan m/z, características de elución, correlación, aductos y patrones isotópicos para reducir las ambigüedades de la búsqueda simple basada en masas (Broeckling et al., 2014; Daly et al., 2014; Giavalisco et al., 2009; Kuhl et al., 2012; Silva et al., 2014; Varghese et al., 2012). Los programas como CAMERA (Kuhl et al., 2012) o *AStream* (Alonso et al., 2011), por ejemplo, están específicamente dedicados a la anotación de aductos e isótopos. Un importante desarrollo reciente es el paquete *xMSannotator*. Este se basa en los principios de correlación y coelución e información disponible del conjunto de datos (perfiles de intensidad, características de tiempo de retención, defectos de masa y patrones de isótopos/aductos) para identificar características relacionadas con un metabolito y aumentar la confianza de la anotación. Toma como entrada una tabla de intensidad máxima (una matriz de m/z, tiempo e intensidades en las muestras) y utiliza un algoritmo de puntuación de criterios múltiples para asociar automáticamente los iones detectados por espectrometría de masas con sustancias químicas conocidas (figura 33). El programa utiliza KEGG, HMDB, *toxin and toxin target database* (T3DB) y *ChemSpider* para la anotación (M Kanehisa & Goto, 2000; Lim et al., 2010; Pence & Williams, 2010; D. Wishart et al., 2015; D. S. Wishart et al., 2013). En una comparación con un conjunto aleatorio de 210 metabolitos anotados con espectros de fragmentación (MS/MS) se mostró que el 80 % de las características anotadas por *xMSannotator* con puntajes de confianza altos o medios fueron consistentes.

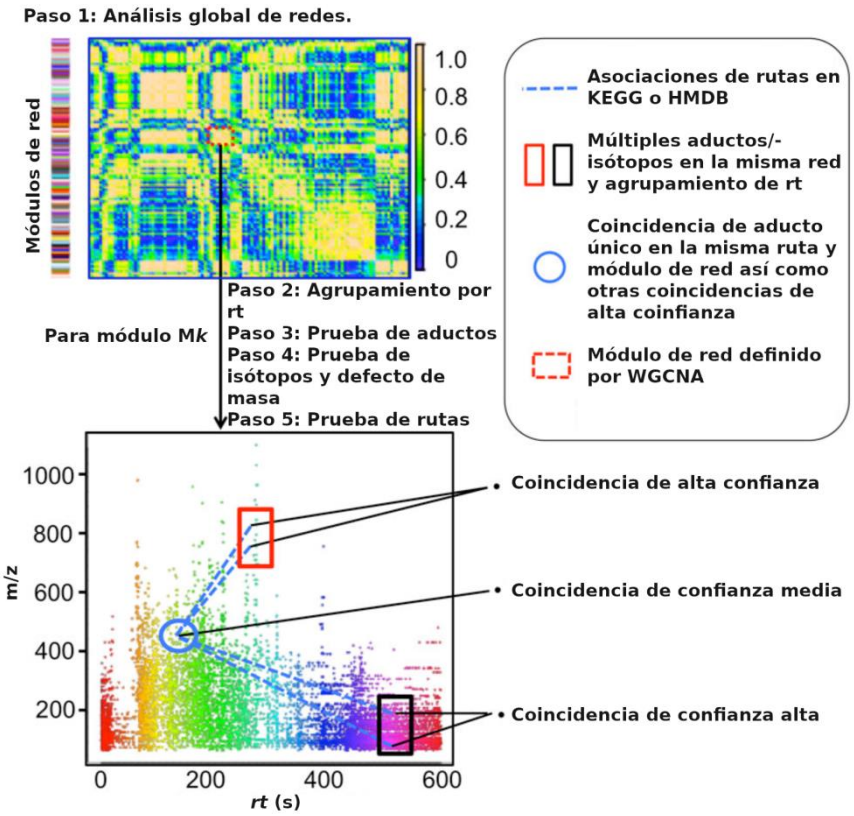


Figura 33. Algoritmo de puntuación e integración de *xMSannotator*. *xMSannotator* utiliza un algoritmo de puntuación de varias etapas para asignar coincidencias de base de datos en diferentes niveles de confianza de anotación. En el primer paso, se obtienen módulos de red utilizando las intensidades de todas las muestras. En el paso dos, cada módulo, $\mathbf{M}_k$, se subagrupa adicionalmente según el tiempo de retención, $\mathbf{M}_{kt}$. En los pasos tres y cuatro, los patrones de isótopos y aductos se utilizan para la comparación de bases de datos dentro de cada submódulo, $\boldsymbol{M}_{kt}$. En el paso cinco, se incorpora la información de la ruta de KEGG o HMDB para enriquecer el nivel de confianza de las coincidencias de baja confianza si hay una coincidencia de alta confianza en la misma ruta y módulo, $\mathbf{M}_k$. Coincidencia de alta confianza: se cumplen todos los criterios de los pasos 1 a 4; Coincidencia de confianza media: se cumple el criterio del paso 5. Adaptado de (Uppal et al., 2017).

xMSannotator utiliza un algoritmo de puntuación para la anotación, según se describe a continuación:

1. Análisis de correlación: análisis de correlación por pares entre todas las *features* medidas, donde una *feature* es una combinación de m/z, tiempo de retención (RT) e intensidad asociada. Los usuarios tienen la opción de utilizar la correlación de *Pearson* o *Spearman*.

2. Análisis de modularidad de red: los módulos de red basados en los datos se definen utilizando el método WGCNA (Langfelder & Horvath, 2008). El algoritmo utiliza la matriz de correlación por pares del paso 1 para generar una matriz de adyacencia, A_{ij}. En el siguiente paso, se calcula una medida de disimilitud utilizando la matriz de adyacencia, que luego se utiliza para el análisis de *clustering* e identificar módulos de coexpresión de *features*. Cada módulo, M_k, se compone de una seria de *features* estrechamente conectadas entre sí (B. Zhang & Horvath, 2005). Este enfoque es más sólido que el análisis de correlación simple, que es sensible a la elección del umbral de correlación y podría conducir a

la pérdida de información (B. Zhang & Horvath, 2005). La información de pertenencia a un módulo se usa para filtrar coincidencias incorrectas como se describe en el paso 6.

3. Agrupamiento basado en el tiempo de retención: dentro de cada módulo M_k, se identifican submódulos de *features* coeluyentes, M_{kt}, mediante una ténica denominada *kernel density estimation*.

4. Análisis de diferencia de masa: las *features* dentro de cada submódulo, M_{kt}, se agrupan según la diferencia entre la masa experimental medida y la masa nominal, para identificar grupos con un patrón isotópico (+1 , +2), potenciales aductos o fragmentos internos de un metabolito (Y. F. Xu et al., 2015; Haiying Zhang et al., 2009).

5. Coincidencia en base de datos: después de agrupar las características en los pasos 2 a 4, las *features* dentro de cada submódulo M_{kt} se comparan con los metabolitos conocidos en las bases de datos químicas (HMDB, KEGG, T3DB o LIPIDMAPS) de acuerdo con el aducto definido por el usuario y un criterio de tolerancia de diferencia de masa en ppm.

6. Asignación de puntaje: después de la comparación en la base de datos, se calcula un puntaje a cada anotación si se cumplen las siguientes condiciones:

I. ¿Las *features* que coinciden con diferentes aductos/isótopos de un metabolito pertenecen al mismo submódulo M_{kt} de los pasos 1 a 4? Este criterio reduce el riesgo de anotaciones incorrectas, ya que requiere que las *features* asociadas con un metabolito estén estrechamente conectadas entre sí en función de sus perfiles de intensidad en las muestras y que también tengan tiempos de retención similares.

II. Si las *features* están en el mismo submódulo M_{kt}, ¿las *features* también están correlacionadas positivamente entre sí? Umbral por defecto: 0.7.

III. Si las *features* están en el mismo submódulo M_{kt} y están correlacionadas positivamente, ¿el rango de RT (máximo-mínimo) entre las *features* coincide con este metabolito dentro de un umbral definido?

7. Incorporación de información biológica. El puntuaje de una anotación aumenta si hay otras anotaciones de la misma vía asignados al mismo módulo de red M_k, tienen un puntaje mayor a 0 en el paso 6 y tienen coincidencias para aductos/iones definidos por el usuario.

8. Asignación del nivel de confianza: cada anotación se clasifica como de no confianza (0), confianza baja (1), confianza media (2) y confianza alta (3) según los siguientes criterios:

I. El puntaje es mayor a cero.

II. Presencia de los aductos/formas especificadas por el usuario para la asignación a categorías de alta confianza (ej. M+H).

III. Comprobación de la relación N, O, P, S/C (Kind & Fiehn, 2007).

IV. Comprobación de la relación hidrógeno/carbono (Kind & Fiehn, 2007).

V. Comprobación de la relación de abundancia para isótopos, multímeros (dímeros y trímeros) y aductos de carga múltiple con respecto a los aductos e iones de carga única de acuerdo con reglas heurísticas.

Una coincidencia de confianza alta satisface todos los criterios, la confianza media se asigna en función del criterio del paso 7, las coincidencias de confianza baja tienen una puntuación superior a 0, pero no satisfacen las comprobaciones de proporción elemental o proporción de abundancia. Las coincidencias sin confianza tienen una puntuación <=0; esto debe interpretarse como un nivel de identidad de 5 según lo definido por (Schymanski et al., 2014).

9. Evaluación y corrección de redundancia: la puntuación asignada a cada anotación en los pasos 6 y 7 se utiliza para reducir la redundancia en las coincidencias mediante la asignación de la anotación de mayor puntaje a aquellas *features* con múltiples aciertos.

Después de la anotación del metabolito, para lograr una identificación se requieren al menos dos datos independientes y ortogonales en relación con un estándar de referencia analizado en condiciones experimentales idénticas (tiempo de retención y masa precisa, masa precisa y espectro de masas en tándem, etc.) (Dunn et al., 2012; Sumner et al., 2007). Para los estudios de GC-MS, se utiliza para la identificación de metabolitos índices de retención estandarizados derivados de experimentos anteriores y recopilados en bases de datos, pero actualmente no existe tal índice para los experimentos de LC-MS. En ese caso, con frecuencia se realizan experimentos adicionales de MS o MS en tándem (MS/MS) con un estándar de referencia ejecutado en las mismas condiciones (Dunn et al., 2012; Sumner et al., 2007). Se necesita un esfuerzo considerable para construir una biblioteca de referencia, que a menudo es de tamaño e interoperabilidad limitados. Por lo tanto, la identificación de metabolitos constituye el cuello de botella de la metabolómica no dirigida (Dunn et al., 2012; Sumner et al., 2007).

1.6. Análisis de rutas

El análisis de rutas permite detectar mecanismos biológicos en los que están implicados los metabolitos identificados o anotados. Esto incluye herramientas para encontrar y analizar la conectividad de la ruta, ayudar en la identificación de metabolitos e integrar con otros estudios ómicos como transcriptómica y proteómica. Algunos métodos de análisis de rutas metabólicas se toman directamente del análisis de rutas de genes, como el análisis de enriquecimiento. El análisis de enriquecimiento de la ruta prueba si un grupo de metabolitos está involucrado en una ruta particular en comparación con resultados aleatorios. Entre los programas gratuitos de uso común para los análisis de vías se encuentra MSEA (*metabolite set enrichment analysis*) (Xia & Wishart, 2010) y *mummichog* (Shuzhao Li et al., 2013). El análisis de enriquecimiento de rutas también está disponible a través de herramientas comerciales como *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA, *Ingenuity Systems*), *Pathway Studio* (*Ariadne Genomics*) y *MetaCore* (*GeneGo*). La mayoría de estas herramientas están basadas en el conocimiento previo den rutas registradas en bases de datos. Se utilizan repositorios como KEGG (M Kanehisa & Goto, 2000), *Recon1* (Thiele et al., 2013) y *Biocyc* (Karp et al., 2005) para los análisis de vías.

El análisis de enriquecimiento de conjuntos de metabolitos, MSEA, (Xia & Wishart, 2010) es la contrapartida metabolómica del análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) (Subramanian et al., 2005), que se ha utilizado ampliamente en el análisis de datos de expresión génica. MSEA ensambla conjuntos de metabolitos predefinidos a través de bases de datos públicas (como HMDB y KEGG) y minería de texto en literatura. Usando estos conjuntos de metabolitos como punto de partida, MSEA permite a los investigadores realizar un análisis de enriquecimiento en una lista de metabolitos alterados para sugerir una vía biológica alterada o una condición de patológica asociada que pueden investigarse a más profundidad. Un algoritmo similar ha sido publicado, MPEA (*metabolite pathway enrichment analysis*), que puede admitir identificaciones ambiguas de metabolitos (Kankainen et al., 2011).

Mummichog, un término que hace referencia a los peces pequeños que viven en grupos, es tanto una herramienta de anotación de metabolitos como de enriquecimiento de rutas (Shuzhao Li et al., 2013). En contraste con el enfoque convencional que realiza la identificación de metabolitos antes del análisis de rutas, *mummichog* evita este cuello de botella aprovechando el conocimiento a priori de la vía para inferir directamente la actividad biológica en función de las *features* de MS (figura 34). La premisa básica es que si una lista de *features* significativas refleja una actividad biológica, los verdaderos metabolitos que representan deberían mostrar un enriquecimiento en una estructura local en la red metabólica (Deo et al., 2010), mientras que los metabolitos con coincidencias falsas se distribuyen más al azar. Esto brinda un medio para predecir funciones alteradas sin la identificación inicial de metabolitos. Para utilizar una red metabólica humana de referencia, se integró KEGG (Minoru Kanehisa et al., 2006), UCSD *Recon1* (Duarte et al., 2007) y la *Edinburgh human metabolic network* (H. Ma et al., 2007). Del usuario *mummichog* requiere dos listas de *features*, la lista significativa L_{sig} (por ejemplo, seleccionada por estadísticas univariadas) y la lista de referencia L_{ref} (todas las características detectadas en el experimento de MS). A partir de las *features* en Lsig, *mummichog* calcula todos los metabolitos posiblemente coincidentes y busca en la red metabólica de referencia todos los módulos que pueden formar estos metabolitos tentativos. Se extraen listas aleatorias de características m/z de L_{ref} muchas veces para estimar la distribución nula de las actividades del módulo. La significancia estadística de los módulos de L_{sig} se puede calcular a partir de esta distribución nula. De esta manera, los metabolitos predichos en estos módulos significativos (y de manera similar para las vías) son más plausibles de ser correctos y forman la "red de actividad" para un experimento dado.

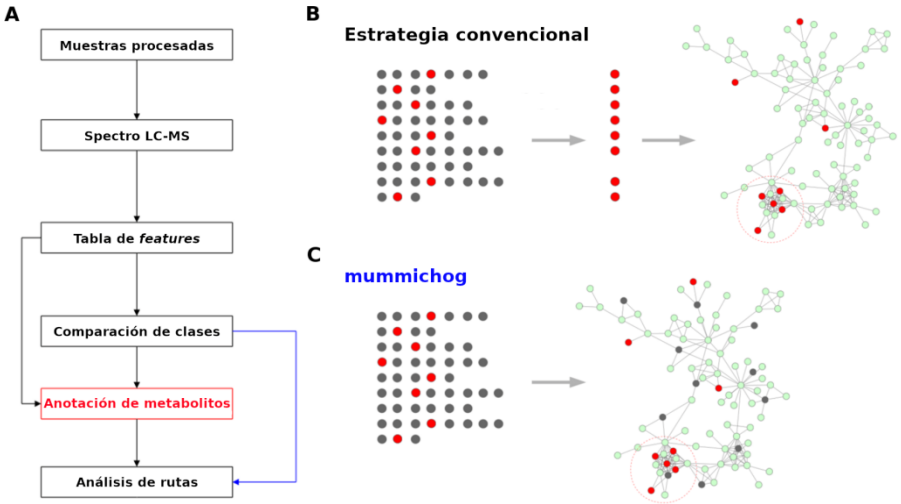


Figura 34. Estrategia de análisis de rutas de *mummichog*. A) En el flujo de trabajo de la metabolómica no dirigida, el enfoque convencional requiere que los metabolitos se identifiquen antes del análisis de vías/redes, mientras que *mummichog* (flecha azul) predice la actividad funcional sin pasar por la identificación de metabolitos. B) Cada fila de puntos representa posibles coincidencias de metabolitos de una característica m/z, en rojo el metabolito verdadero, en gris las coincidencias falsas. El enfoque convencional primero requiere la identificación de metabolitos antes de mapearlos en la red metabólica. C) *mummichog* mapea todas las posibles coincidencias de metabolitos en la red y busca el enriquecimiento local, que reflejaría la verdadera actividad porque las coincidencias falsas se distribuirán aleatoriamente. Adaptado de (Shuzhao Li et al., 2013).

Otra estrategia importante es el análisis de la estructura de las redes metabólicas así como la integración con otros tipos datos. La información aportada por varias fuentes ómicas puede complementarse y apoyarse entre sí dando una imagen más completa de un proceso biológico (Fiehn, 2001; Hawkins et al., 2010; Meng et al., 2016; Wanichthanarak et al., 2015). xMWAS es una herramienta reciente que proporciona un flujo de trabajo automatizado para la integración por pares de múltiples conjuntos de datos; visualización en red de los mismos; detección de comunidades y análisis diferencial de redes (figura 35). En la primera etapa, xMWAS utiliza técnicas de reducción de dimensiones como PLS (*Partial Least Squares*) y SPLS (sparse PLS) para la selección de variables e integración por parejas (González et al., 2012; Lê Cao et al., 2009; Liquet et al., 2012). El paquete *R plsgenomics* se utiliza para determinar el número óptimo de componentes latentes. El paquete *igraph* en *R* se usa para generar una integrada de los múltiples datos (Csardi & Nepusz, 2005). La detección de comunidades implementada revela módulos compuestos por biomoléculas funcionalmente relacionadas (Blondel et al., 2008). Métricas derivadas de la topología de la red (*eigenvector centrality*, *betweenness centrality*) se utilizan para evaluar y comparar la importancia de los nodos entre diferentes condiciones (Lichtblau et al., 2017; Odibat & Reddy, 2012). El análisis de red diferencial permite la caracterización de nodos que experimentan cambios en las características topológicas entre diferentes condiciones (Lichtblau et al., 2017).

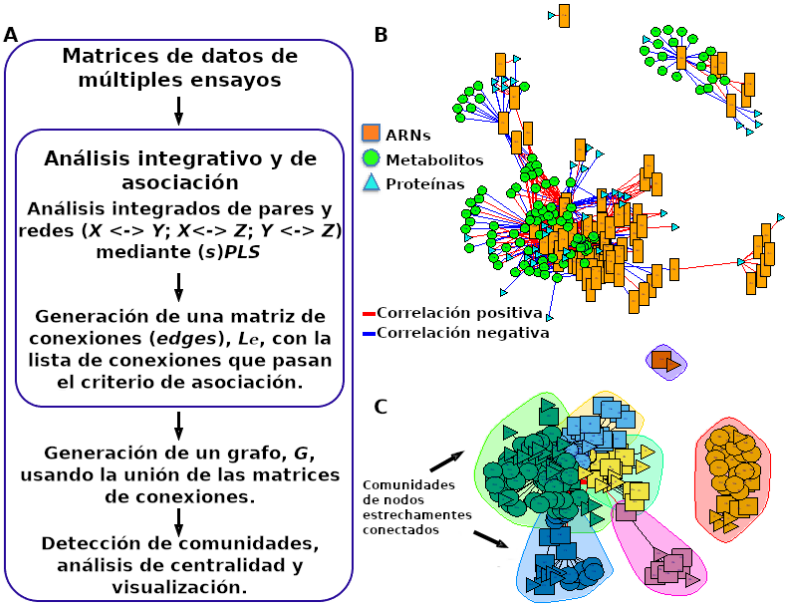


Figura 35. Flujo de trabajo de xMWAS. A. Las matrices de datos pueden obtenerse de estudios observacionales o experimentales con suficiente variación biológica como para esperar una respuesta asociada en los datos ómicos. Los análisis de integración de datos y de correlación por pares se realizan para cada elemento de cada matriz utilizando (s)PLS. Las asociaciones se clasifican de acuerdo a un puntaje y los valores principales se filtran mediante criterios estadísticos. Las matrices de conexión por pares se fusionan para generar una red de asociación global. Los grupos de nodos muy conectados se identifican mediante el algoritmo de detección de comunidad multinivel. Las redes se visualizan utilizando una herramienta de visualización (por ejemplo, *igraph*; *Cytoscape*). B. Ilustración de la red de asociación para el conjunto de datos NCI60: proteínas (triángulo), metabolitos (círculo) y transcriptos (rectángulo). C. Identificación de comunidades en la red integrada NCI60 utilizando el algoritmo de detección de comunidades multinivel. Adaptado de (Uppal et al., 2018).

1.7. Limitaciones

Los estudios metabolómicos tienen varias dificultades y limitaciones. La gran cantidad y variedad de metabolitos con diversas propiedades fisicoquímicas presentes en un organismo hacen que la verdadera metabolómica sea inalcanzable con las técnicas actuales (Dettmer et al., 2007). La preparación de muestras (lisis celular, extinción de enzimas y extracción de metabolitos), el almacenamiento de muestras, la condición del instrumento y el entorno de operación también pueden inducir variaciones no deseadas en la detección de metabolitos (Zelena et al., 2009). Aparte de la cobertura de metabolitos, estas variaciones incluyen fluctuaciones intrínsecas de los instrumentos como el desplazamiento de los tiempos de retención, la alteración de los valores de intensidad, la variación de la ionización y calibración de la masa. El análisis de los datos metabolómicos se complica aún más por la variabilidad inherente y la singularidad de los sistemas biológicos que pueden verse perturbados por una serie de factores ambientales o experimentales, como la edad, la dieta, la fase de crecimiento, los medios, los nutrientes, el pH, el sexo y la temperatura (Álvarez-Sánchez, Priego-Capote, & Castro, 2010; Álvarez-Sánchez, Priego-Capote, & Luque de Castro, 2010; Rubakhin et al., 2011). Además, hay una gran cantidad de metabolitos desconocidos que permanecen sin anotar en las bases de datos de metabolitos (Zamboni et al., 2015).

Una combinación de métodos para la extracción y detección de metabolitos puede usarse para compensar la capacidad de cada técnica y su sesgo hacia clases específicas de metabolitos (Ivanisevic et al., 2013; Naz et al., 2013). Además, para minimizar y evaluar la variabilidad analítica y la posible contaminación, generalmente se implementan algunos procedimientos tales como: aleatorización y análisis ciego de las muestras; análisis de muestras de control de calidad (QC); uso de estándares internos agregados a las muestras durante la extracción y/o previo al análisis por LC-MS; uso de réplicas analíticas y blancos; etc. (Broadhurst et al., 2018). Las muestras QC normalmente consisten en una mezcla homogénea de alícuotas de muestras. Estas corridas pueden detectar fácilmente la variación analítica a través de estadísticas globales como el coeficiente de variación (CV) o utilizando métodos de proyección como el PCA.

Los análisis de vías metabólicas también se ven obstaculizados por la falta de una estructura completa del metaboloma de un organismo, la falta de identificación de metabolitos y de la composición subcelular de metabolitos. Además, los estudios de metabolómica convencionales no proporcionan tasas de flujo, las que si pueden obtenerse mediante estudios más acotados de trazas de isótopos estables. En ese sentido estudios temporales del metaboloma (*time-course snap-shots*) también ayudan en la reconstrucción de redes metabólicas (Fiehn, 2001).

2. Estrategia experimental (metabolómica)

La metabolómica tiene como objetivo estudiar globalmente todas las pequeñas moléculas contenidas en una célula, tejido y en última instancia un organismo, lo que a su vez refleja cambios en otros niveles regulatorios como el transcriptómico y el proteómico (Shuzhao Li et al., 2016). En esta tesis se siguió un análisis metabolómico no dirigido para identificar posibles metabolitos y rutas metabólicas alteradas en los astrocitos Tg.Old.

De manera similar al análisis transcriptómico, se establecieron cultivos para los tres grupos experimentales considerados (Tg.Old, Tg.Neo, Wt.Neo), en el formato de placas de 6 pocillos comúnmente utilizado para metabolómica de células adherentes. La etapa de detención del metabolismo celular (*quenching*) y extracción de metabolitos se realizó adaptando los procedimientos de Go y col. así como de Sapcariu y col. con algunas modificaciones (Y. M. Go et al., 2015; Sapcariu et al., 2014). Cada muestra consistió en tres pocillos de una placa. Se retiró el medio condicionado, conservando una alícuota para su análisis, y se lavó la placa con solución salina a temperatura ambiente (1 mL por well). Los metabolitos se extrajeron con una mezcla de acetonitrilo-agua (2 a 1) en hielo agregado directamente sobre cada pocillo (300 uL). Rápidamente se realizó el raspado de la monocapa celular y colección de la muestra en tubos *eppendorf*. Tras una incubación en hielo (30 min) se removió la fracción insoluble de proteínas precipitadas mediante centrifugación. Cada sobrenadante fue transferido a un tubo con tapón de rosca y secado en *speed vac*. Si bien no se reportan en el análisis final debido a la redundancia de los resultados, se procesaron también de manera similar muestras de medio condicionado. Se tomó una alícuota de cada medio (50 uL) y se agregó a un tubo conteniendo la misma mezcla acetonitrilo-agua (2 a 1) (450 uL). Esto incluyó una muestra de medio de cultivo fresco (no condicionado) a modo de control del consumo de metabolitos. Tanto la extracción de metabolitos, como las etapas experimentales siguientes se realizaron sin conocer la identidad de la muestra evitando cualquier sesgo introducido por el experimentador.

Las muestras se enviaron y procesaron en la *Division of Pulmonary, Allergy, Critical Care and Sleep Medicine* de la Universidad de Emory (Atlanta, EEUU), mediante cromatografía liquida acoplada a espectroscopia de masas (LC-MS). Se utilizó un equipo de cromatografía líquida dual (columnas HILIC y C18) acoplado a un espectrómetro de masas *High Field Q Exactive*. Las muestras reconstituidas en solución de extracción (10 s *vortex*, agitación *overnight* a 4 °C) fueron inyectadas por triplicado (réplicas técnicas) junto con 6 muestras de referencia (plasma humano) como control de calidad (*quality control*, *QC*). Los datos se adquirieron en modo positivo y negativo y se registraron en archivos crudos de formato .raw (Thermo).

De manera similar al análisis transcriptómico y considerando la amplia variedad de herramientas disponibles para procesar datos crudos de un estudio metabolómico, también se recurrió herramientas implementadas en lenguaje R para estos pasos. Asimismo se escogió trabajar con versiones locales de los distintos programas, ya que comúnmente las implementaciones en línea como *XCMS online*, *Workflow4Metabolomics* (*W4M*) y *GalaxyM* se ven limitadas por el espacio de almacenamiento ofrecido (Spicer et al., 2017).

El procesamiento involucró los siguientes pasos:

1. Detección de masas (*features*). Los archivos crudos fueron convertidos al formato .cdf y procesados en el paquete *apLCMS* utilizando varias combinaciones de parámetros de detección (Yu et al., 2013).
2. Integración de resultados y control de calidad. Los resultados obtenidos con distintos criterios de detección de unificaron mediante el software *xMSanalyzer* (Uppal et al., 2013). El mismo realiza un control de calidad de las muestras de acuerdo a criterios de coeficiente de variación y presencia de ciertos estándares en las muestras entre otros. Las réplicas técnicas se integraron como la mediana. El resultado de esta etapa es la matriz de masas detectadas (presuntos metabolitos). Dependiendo de la columna utilizada (HILIC, C18) y el tipo de muestras (extracto celular, medio condicionado) se detectaron en el orden de 10000 masas.
3. Análisis estadístico. Empleando el software *xmsPANDA* se procedió a la normalización y detección de metabolitos diferencialmente expresados. Este paquete permite además realizar un curado adicional de los datos (remoción de masas presentes en menos del 50 % de las muestras totales o menos del 80 % de las muestras de un grupo, imputación de valores ausentes (*halffeaturemin*), etc.

   De manera similar al procesamiento de datos de transcriptoma o *microarray*, es necesario normalizar los datos para corregir distintos sesgos en las muestras. Se consideraron varias estrategias, basadas en principios como el de la intensidad total de la señal de un cromatograma, metabolitos hospederos (*house keeping*), etc. (paquetes *Rrmix*, *EigenMS*, *NormMet*). En particular se tomó la normalización por cuantiles.

   Se recurrió a estadística multivariada (PCA, PLS, etc.) y univariada (LIMMA) para evaluar la distribución de los grupos e identificar características discriminantes. Se consideraron como diferencialmente expresadas aquellas masas con un p-valor inferior al 0.05 y ratio de falsos positivos inferior al 20 %.

   Para su publicación algunas figuras se obtuvieron con el servidor *MetaboAnalyst*, el cual implementa la mayoría de los métodos mencionados (Pang et al., 2021).
4. Anotación de masas y análisis de rutas metabólicas. En esta etapa se realiza la anotación de metabolitos el valor de la masa exacta, presencia de aductos, etc. mediante el software *xMSannotator* (Uppal et al., 2017). Asimismo, las masas identificadas como diferencialmente expresados se sometieron a un análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas mediante el programa *mummichog* (Shuzhao Li et al., 2013). Este programa acopla el análisis de enriquecimiento con la anotación de los metabolitos, partiendo de la hipótesis de que metabolitos alterados estén funcionalmente relacionados.
5. Curado y pre-validación. La información proporcionada por *mummichog* es complementaria a las anotaciones dadas por *xMSannotator*, por lo que parte de las anotaciones de KEGG se refinaron tomando un consenso entre ambas herramientas. El otros casos se curó manualmente a efectos de eliminar anotaciones múltiples y anotaciones espúreas (ej. xenobióticos).

   Como un primer acercamiento a la validación experimental se realizó la comparación de las listas de metabolitos anotadas contra una tabla de metabolitos de referencia pre-validados por nuestros colaboradores en la Universidad de Emory (K. H. Liu et al., 2020). Se tomaron

anotaciones como válidas si el tiempo de retención de referencia es similar al tiempo de retención observado para las muestras de plasma. En general se observaron diferencias en el orden de los 20 segundos, las cuales tienden a ser constantes si se consideran metabolitos pertenecientes al mismo grupo químico. Asimismo se constata que en la mayoría de los casos se detectó prácticamente la misma masa y aductos que los reportados en la tabla de referencia. Además, la asociación de distintos grupos de metabolitos con regiones específicas del cromatogama permite apoyar otras anotaciones.

Además del análisis precedente, se realizó la integración de los resultados metabolómicos y transcriptómicos con xMWAS*,* una herramienta basada en el método de regresión de mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLS) (Uppal et al., 2018). Este programa realiza además una detección de comunidades, grupos de nodos mayormente conectados entre sí que con el resto de la red (Blondel et al., 2008). Para este análisis se preservó la normalización utilizada en cada conjunto (*voom* para transcriptos y cuantiles para las *features* metabólicas, ambos conjuntos transformados al logaritmo). Se tomaron todas las combinaciones posibles entre conjuntos ya que estos proceden de diferentes muestras. Se ensayaron varios puntos de corte (top 100, 400, 600, etc. transcriptos/metabolitos correlacionados), porcentaje de correlación (<40 %, 60 %, etc.) y distintos subconjuntos de datos (total vs estadísticamente significativos). Asimismo se compararon tanto datos de transcriptoma contra metaboloma como de metaboloma entre sí (metabolitos detectados en medio de cultivo condicionado vs metabolitos detectados en extractos celulares). Se evaluó si los resultados presentaban sentido biológico según su enriquecimiento en rutas KEGG (plataformas DAVID, STRING y *mummichog)*, seleccionándose finalmente las asociaciones con un umbral de correlación $|r| > 0,6$ y p.valor < 0,05 determinados por el programa (Dennis et al., 2003; Szklarczyk et al., 2019).

En última instancia se validó experimentalmente la alteración intracelular del metabolito glutamato. Los astrocitos tienen un rol clave en la homeostasis de este metabolito y neurotransmisor (Andersen et al., 2021; Waagepetersen et al., 2009; Walls et al., 2014). Alteraciones en su metabolismo se han asociado a procesos neurodegenerativos (Andersen et al., 2021). Evidencia del estudio de caracterización *in vitro*, aunque estadísticamente no significativa, sugiere un aumento marcado en la expresión proteica de la enzima MAO-B, lo que podría estar asociado con una alteración en el metabolismo del GABA (Diaz-Amarilla et al., 2022). Esta molécula constituye otro neurotransmisor relevante para la función astrocitaria y la patología de la EA (Diaz-Amarilla et al., 2022), motivo por el que también se evaluó su expresión en los astrocitos Tg.Old (Chun et al., 2018; Jo et al., 2014; Walls et al., 2014). El análisis se realizó con la colaboración de la Plataforma Analítica del IIBCE, quienes ajustaron el método de Soo Hyun Park y col. (*Thermo Scientific, application note 73151*) para así detectar y cuantificar aminoácidos en muestras de extractos celulares y medios condicionados (no presentado) utilizando un equipo UHPLC con detector de masa (simple cuadrupolo) ISQ-EC.

3. Resultados y discusión (metabolómica)

3.1. Características globales del perfil metabolómico de astrocitos Tg.Old

En esta tesis utilizamos una estrategia de metabolómica no dirigida para identificar posibles metabolitos y vías metabólicas alteradas en los astrocitos Tg.Old. Como se comentó en metodología el análisis se realizó utilizando extractos celulares de estas células así como de astrocitos Tg.Neo y Wt.Neo bajo dos esquemas analíticos, cromatografía basada en columna C18 con modo de ionización negativa (C18-) y cromatografía basada en columna HILIC con modo de ionización positiva (HILIC+) respectivamente. Siguiendo los criterios de filtrado se detectaron alrededor de 5k y 6k *features* en cada una de las adquisiciones respectivamente. Al igual que el perfil transcriptómico, el análisis de componentes principales de estos posibles metabolitos confirma la mayor semejanza entre los astrocitos obtenidos de animales no sintomáticos (Wt.Neo, Tg.Neo) (figura 36). Sin embargo, a diferencia del mismo, las características con valor discriminatorio solo abarcan alrededor del 10 % de la variación observada, lo que podría corresponderse en una cantidad relativamente menor de metabolitos discriminantes.

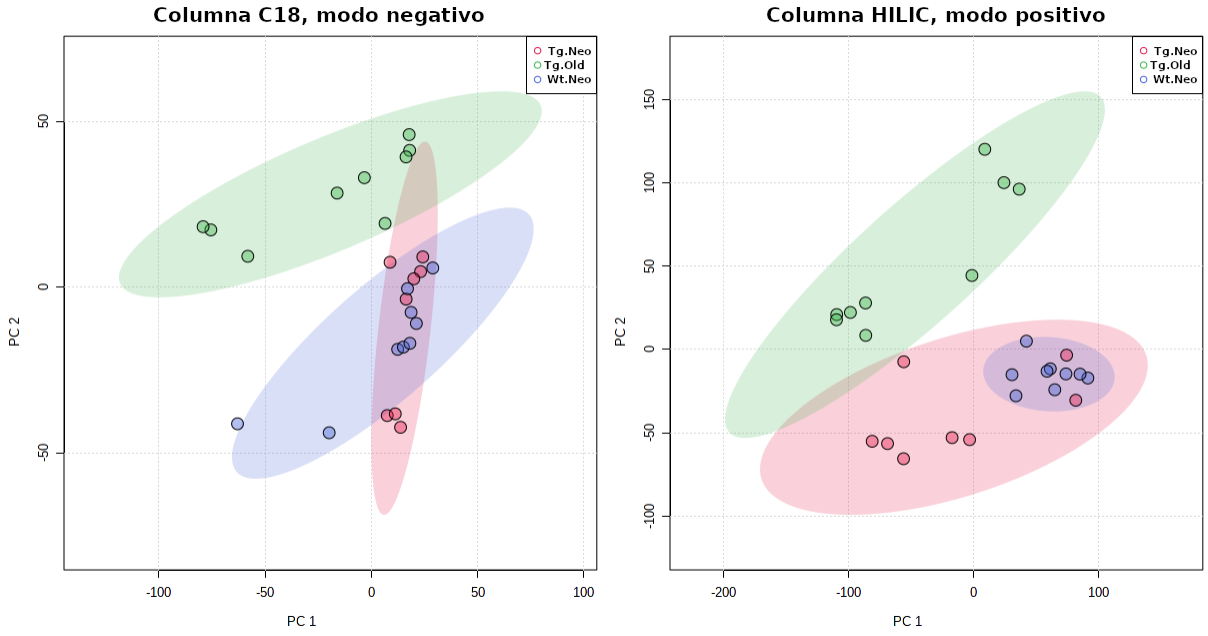


Figura 36. Análisis de componentes principales (gráfico de puntuaciones) de los metabolitos detectados en extractos celulares de astrocitos neurotóxicos y neonatales del modelo 3xTg-AD. Izquierda: metabolitos detectados con cromatografía basada en columna C18 y modo de ionización negativa, derecha: metabolitos detectados con cromatografía basada en columna HILIC y modo de ionización positiva. Figura obtenida con el servidor *MetaboAnalyst* (Pang et al., 2021).

Para la selección de *features* expresadas diferencialmente se utilizó la estadística de LIMMA con un umbral más indulgente que en el estudio de transcriptoma (FDR <0.2). Esto resultó en alrededor de 400 y 1000 *features* de los conjuntos de datos C18- e HILIC+ respectivamente. Un análisis de agrupamiento jerárquico de estos resultados confirma la separación de los astrocitos Tg.Old respecto de los Tg.Neo y el valor discriminante de las *features* seleccionadas (figura 37A). Su distribución con respecto a la m/z

sugiere propiedades químicas similares respecto del resto de las *features* metabólicas (ver diagramas de Manhattan en figura 37B). Alrededor del 36 % y 38 % de las *features* C18- y HILIC+ respectivamente seleccionadas están reguladas al alza.

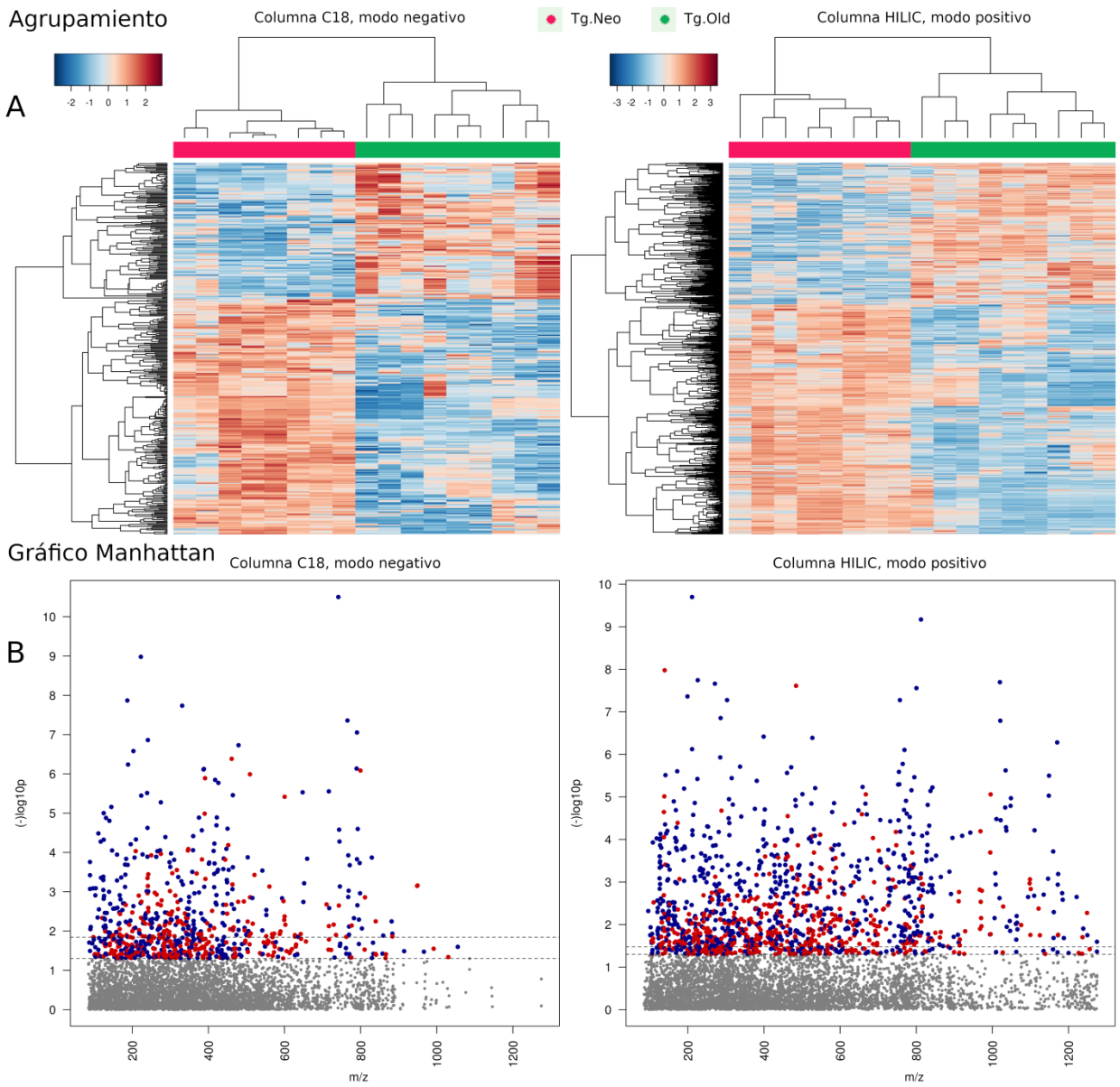


Figura 37. Características metabólicas expresadas diferencialmente detectadas en extractos celulares de astrocitos neurotóxicos y neonatales del modelo 3xTg-AD (análisis LIMMA). A. Análisis de agrupamiento (todas las características significativas en filas, muestras en columnas). B. Diagrama de Manhattan tipo 1 que presenta el -log10(*p*-valor) de las *features* metabolicas en función de su relación masa/carga. Izquierda: metabolitos detectados con cromatografía basada en columna C18 y modo de ionización negativa, derecha: metabolitos detectados con cromatografía basada en columna HILIC y modo de ionización positiva. De abajo hacia arriba, las entidades por encima de la primera línea discontinua horizontal fueron significativas con un valor $p < 0,05$, y por encima de la segunda línea discontinua fueron significativas con un valor q (FDR) < 0,2. Se seleccionaron un total de 382

características de 5294 características filtradas detectadas por cromatografía basada en columna C18 y modo de ionización negativa. Se seleccionaron un total de 1041 características de 6189 características filtradas detectadas por cromatografía basada en columna HILIC y modo de ionización positiva. Rojo: mayor expresión en astrocitos neurotóxicos; azul: expresión inferior. Abreviatura: LIMMA, *linear models for microarray data*.

3.2. Asociaciones entre vías metabólicas y de señalización alteradas

Se anotó el perfil de *features* metabólicas diferencialmente expresadas de acuerdo a un análisis de enriquecimiento y su asociación con los transcriptómica. En términos generales, este perfil ilustra funciones tanto funciones energéticas como regulatorias. Los metabolitos más relevantes detectados pueden asociarse a al ciclo del ácido cítrico, metabolismo del glutamato y rutas inflamatorias. Varias de estas alteraciones son apoyadas por el análisis transcriptómico y son concordantes con el fenotipo característico de los astrocitos.

La figura 38 presenta uno de los resultados del análisis de rutas de *mummichog* para identificar rutas bioquímicas alteradas y obtener anotaciones de metabolitos para las características diferenciales expresadas potencialmente involucradas en las mismas. Los resultados del conjunto de datos C18 pueden resumirse en vías vinculadas al metabolismo central del carbono y al metabolismo de los aminoácidos, como la glicina, la serina, la alanina y la treonina, el metabolismo del glutamato y la glucólisis y la gluconeogénesis. Los resultados del conjunto de datos HILIC incluyen vías relacionadas con el metabolismo del ácido araquidónico además de vías relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos. Las anotaciones de los metabolitos asociados se complementaron con los resultados del paquete *xMSAnnotator*. Se anotaron hasta 100 características expresadas diferencialmente de los conjuntos de datos C18 y HILIC con niveles de confianza medios y altos (ver Apéndice 1.2.1). Asimismo, estas anotaciones se respaldaron mediante la comparación con una lista interna de metabolitos previamente validados (K. H. Liu et al., 2020) tal como se presenta en la tabla 1. Estos metabolitos anotados de mayor confianza ilustran y respaldan las vías sugeridas.

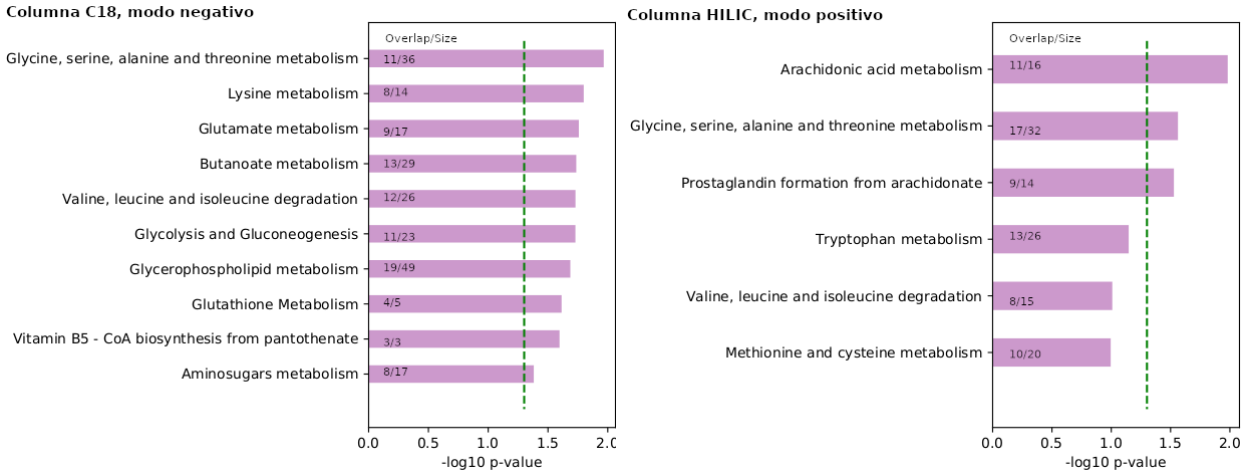


Figura 38. Análisis de rutas de *mummichog* de *features* metabólicas diferencialmente expresadas. *Size*: número total de metabolitos conocidos en una vía determinada, *Overlap*: número de características metabólicas

coincidentes que se encuentran diferencialmente expresadas. Se consideró que las vías diferían entre los grupos si $p \leq 0,05$ y superposición > 4.

Tabla 1. Metabolitos celulares prevalidados detectados por metabolómica de alta resolución. Las anotaciones de metabolitos seleccionados se respaldan en base a la comparación con una base de datos interna de metabolitos previamente confirmados (aducto, m/z y tiempo de retención similares) (K. H. Liu et al., 2020). Información sobre rutas metabólicas recopilada a partir de los resultados de *mummichog* y las anotaciones de metabolitos de KEGG.

METABOLITOS CELULARES								
ID	**Confianza**	**Mz**	**tiempo**	**p-valor**	***Max fold change* (log2)**	**Nombre**	**Aducto**	**Rutas**
C05984	2	103.0400	48.5	0.0012	-0.93	2-Hidroxibutirato	M-H	*Butanoate metabolism*
C03761	2	161.0456	50.9	0.0026	-1.72	3-Hidroxi-3-metilglutarato	M-H	
C01879	3	130.0499	94.4	0.0004	-1.82	5-Oxoprolina	M+H	*Glutathione metabolism*
C06428	3	301.2175	191.7	0.0055	0.94	Ácido eicosapentanoico	M-H	
C02693	2	175.0866	64.6	0.0292	-0.80	Indol-3-acetamida	M+H	*Tryptophan metabolism*
C00637	3	158.0611	78.3	0.0106	-1.16	Indolacetaldehido	M-H	*Tryptophan metabolism*
C00025	3	147.0490	33.7	0.0138	1.72	L-Glutamato	M-H_[-1]	*Glutamate metabolism*
C00186	3	89.0244	46.1	0.0002	-1.55	L-Lactato	M-H	*Glycolysis and gluconeogenesis*
C00149	2	133.0143	46.4	0.0035	-1.49	L-Malato	M-H	*Glycolysis and gluconeogenesis*
C00065	2	106.0499	116	0.0165	-2.27	L-Serina	M+H	*Glycine, serine and threonine metabolism*
C00078	2	203.0826	50.2	0.0023	-1.61	L-Triptofano	M-H	*Glycine, serine and threonine metabolism*
C00624	2	188.0565	35.9	0.0002	-2.14	N-Acetil-L-glutamato	M-H	*Arginine biosynthesis*
C01004	2	138.0550	81.8	0.0123	2.37	N-Metilnicotinato	M+H	*Nicotinate and nicotinamide metabolism*
C00153	3	123.0553	58.7	0.0210	-2.42	Nicotinamida	M+H	*Nicotinate and nicotinamide metabolism*
C02862	2	232.1541	77.5	0.0178	-1.78	O-Butanoilcarnitina	M+H	
C03017	2	218.1386	82	0.0000	-4.90	O-Propionilcarnitina	M+H	
C00245	2	126.0220	78.9	0.0005	-2.94	Taurina	M+H	*Neuroactive ligand-receptor interaction*

Integrando los resultados de metabolómica y transcriptómica mediante la herramienta xMWAS se evidencia un subconjunto de metabolitos (269 para c18) y transcriptos correlacionados (máximo 400) (ver Apéndice 1.2.2). La consistencia de los resultados de xMWAS con el análisis anterior se verificó

mediante un análisis de sobrerrepresentación de DEGs en el servidor web STRING. Entre las rutas a las que estos metabolitos se asocian se destaca: *Glutamate metabolism*, *Glycolysis and Gluconeogenesis* y *Arachidonic acid metabolism*. Si bien el límite es impuesto arbitrariamente por el método, los transcriptos seleccionados se asocian a las vías de *Protein processing in endoplasmic reticulum*, *RNA transport* y *Glycine, serine and threonine metabolism,* entre otras (ver Apéndice 1.2.2).

Se destacan transcriptos correspondientes a las enzimas *Lactate dehydrogenase B* (*Ldhb*, subexpresado), *Phosphofructokinase, muscle* (*Pfkm*, subexpresado), *Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase* (*Ptgis*) (sobre expresado), y *NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B11* (*Ndufb11*, perteneciente al complejo I mitocondrial, sobreexpresado) (figura 39). Dentro de los transcriptos correlacionados se encuentran algunos asociados a funciones regulatorias como *Ern1* (*IRE1α*, asociado al estrés de retículo, sobre expresado) e *Ikbkg* (*Inhibitor of kappaB kinase gamma*, asociado a la vía de *NF-κB*, sobreexpresado).

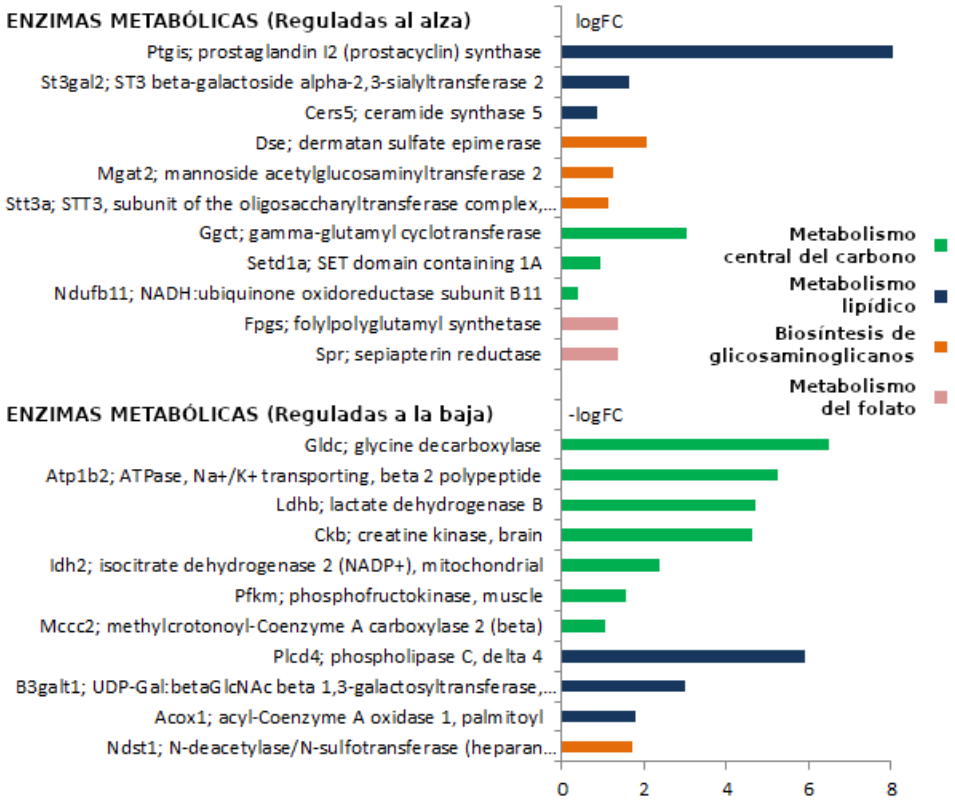


Figura 39. Enzimas seleccionadas basadas en análisis de asociación xMWAS entre transcriptoma y metaboloma. Las enzimas coloreadas en azul están asociadas con el metabolismo de los ácidos grasos y compuestos relacionados (esfingolípidos, glucoesfingolípidos, ácido araquidónico); verde: metabolismo central del carbono (fosforilación oxidativa, metabolismo de aminoácidos, etc.); naranja: biosíntesis de N-glicanos y glicosaminoglicanos; púrpura: metabolismo del folato. Por brevedad, solo se muestran algunos miembros representativos.

En términos generales los DEGs que pueden asociarse al metabolismo del carbono y los ácidos grasos están principalmente regulados a la baja, mientras que algunas enzimas relacionadas con el metabolismo de los esfingolípidos y el ácido araquidónico estarían reguladas al alza. Los metabolitos seleccionados reflejan cambios similares: hay una regulación negativa general de los acidos grasos,

glicerofosfolípidos y ácidos carboxílicos, entre otros metabolitos, y una regulación positiva de algunos metabolitos como el leucotrieno A4. En este sentido, los resultados son consistentes con los hallazgos previos y destacan los DEGs que podrían estar involucrados en las vías metabólicas detectadas. En la figura 40 se presenta un subconjunto de metabolitos correlacionados representativos (ver la lista completa de metabolitos anotados de confianza media y alta en Apéndice 1.2.1).

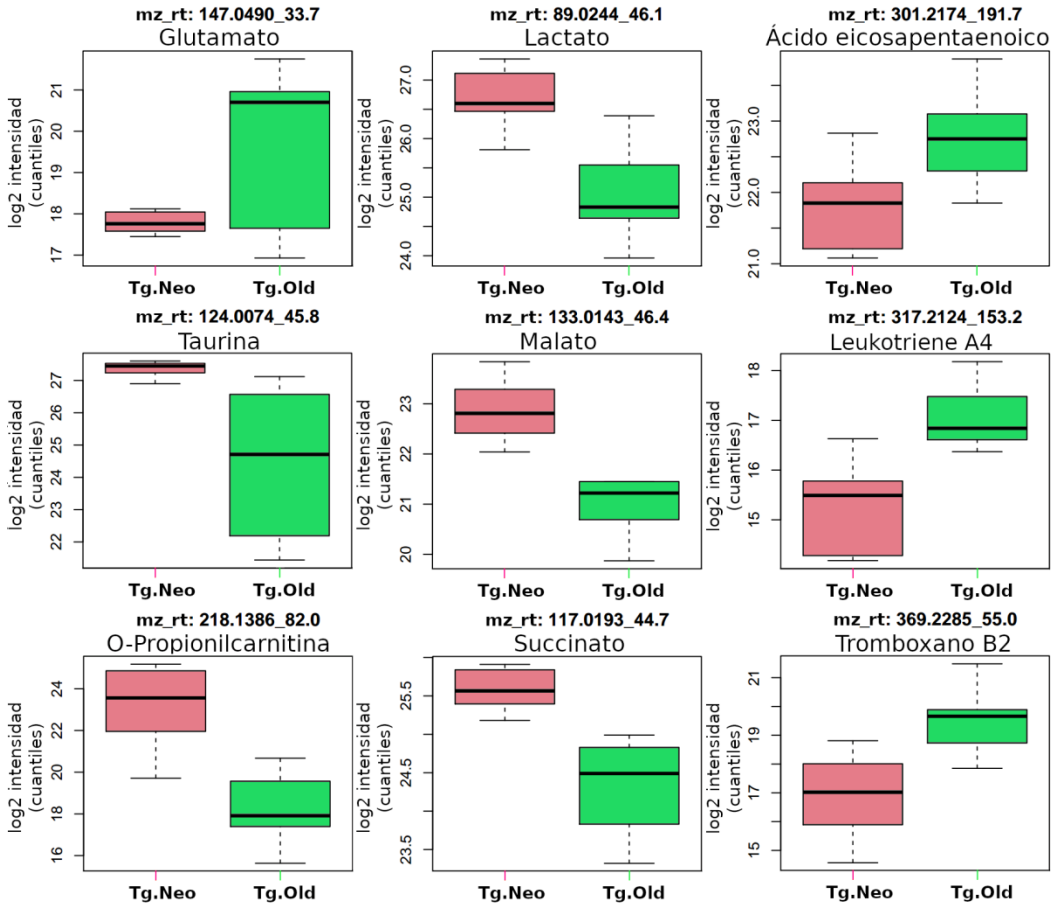


Figura 40. *Box plots* de metabolitos seleccionados mediante metabolómica de alta resolución. Los metabolitos presentados son un subconjunto de metabolitos correlacionados al perfil transcriptómico según el análisis de asociación de xMWAS, y con anotaciones previamente validadas y/o anotaciones de confianza media alta de *xMSAnnotator*. (Ver lista completa en la Apédice 1.2.2).

Si bien el procedimiento identifica una correlación entre los conjuntos de datos no puede descartarse que esto resulte por un fenómeno de *sobreajuste*. Igualmente el procedimiento identifica nodos funcionalmente importantes. Asimismo, el estudio está limitado por el hecho de que las muestras analizadas no son las mismas. Debe tenerse en cuenta que no toda correlación entre conjuntos de datos implica una interacción directa entre los elementos asociados. Los detalles mecanicistas de estas asociaciones también son oscuros y deberían explorarse en futuros estudios.

Vale la pena señalar que las alteraciones sugeridas en el retículo endoplasmático (ER, *endoplasmic reticulum*) podrían ser la base de los cambios metabólicos observados. El ER es el principal

compartimento celular involucrado en el tráfico y plegamiento de proteínas, entre otras funciones. La falla en la capacidad adaptativa del ER da como resultado la activación de respuestas de estrés (Respuesta de proteína desplegada, *Unfolded Protein Response*) que en diferentes contextos pueden resultar en la activación de vías proinflamatorias, alteraciones metabólicas y aumento de la proliferación (D. M. Miller et al., 2012; Sheng et al., 2019; Sprenkle et al., 2017; T. Zhang et al., 2020). Como se mencionó anteriormente, las células malignas ilustran muchos de estos cambios, por ejemplo, a través de la acción del factor de transcripción c-Myc, que curiosamente parece estar regulado al alza en los astrocitos Tg.Old. Las alteraciones relacionadas con el estrés del ER también son críticas en enfermedades metabólicas crónicas como la obesidad y la diabetes tipo 2, por lo que constituyen una diana terapéutica interesante y sugieren un sustrato común entre estos trastornos que puede explorarse en futuros estudios (Hotamisligil, 2010; Martin-Jiménez et al., 2017; Yadav et al., 2014).

3.2.1. Alteraciones clave involucradas en vías de señalización y metabolismo energético de los astrocitos

Los resultados presentados indican perturbaciones en centros esenciales de la homeostasis cerebral, incluido el metabolismo energético, el metabolismo redox, la señalización y los procesos inflamatorios. En particular, el cambio en el aminoácido glutamato se encuentran probablemente entre los más relevantes para la función de los astrocitos (Hertz & Rothman, 2017; Magistretti, 2006) y fue verificado mediante un enfoque específico (figura 41). Su desequilibrio está asociado con la neurotoxicidad, ya que promueve el estrés oxidativo y la inflamación a través de diferentes mecanismos, como la interacción directa con el receptor y la promoción del metabolismo del ácido araquidónico o la privación de glutatión (Herrera et al., 2001). Este fenómeno se ha observado en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluidas la EA y la ELA (Schubert & Piasecki, 2001; Shaw et al., 2001).

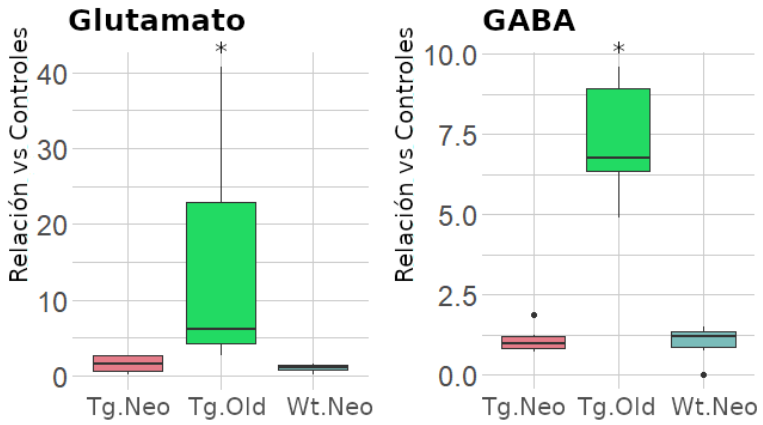


Figura 41. Validación de perturbación de aminoácidos en extractos celulares de astrocitos. Comparación de a pares mediante test de rangos Wilcoxon con corrección de Benjamini-Hochberg. * p.adj < 0.05 para la comparación de Tg.Old vs Tg.Neo y Tg.Old vs Wt.Neo.

Aunque no se logró evidenciar un aumento de glutamato en los medios condicionados (resultados no presentados), la evidencia del análisis transcriptómico indica una pérdida de la capacidad de los astrocitos para regular su homeostasis, por lo que no puede descartarse un posible efecto nocivo *in vivo*.

Además del glutamato detectado en el estudio metabolómico, también evaluamos específicamente el ácido gamma aminobutírico (GABA), otro importante metabolito energético y neurotransmisor intercambiado entre astrocitos y neuronas. Esta alteración fue sugerida por el aumento de la enzima MAO-B propuesto en nuestro primer estudio de caracterización (Diaz-Amarilla et al., 2022). La producción aberrante de GABA mediante esta enzima se ha observado en astrocitos reactivos y podría estar asociada con el deterioro de la memoria en modelos de ratones con AD (Chun et al., 2018; Jo et al., 2014). Asimismo, se ha propuesto que un mayor contenido de GABA astrocitario en las primeras etapas de la EA pueda surgir como un mecanismo de compensación para reducir la hiperactividad neuronal mediada por el depósito amiloide (Assefa et al., 2018).

La alteración de glutamato, y posiblemente de otros aminoácidos, así como de metabolitos de la ruta del ácido araquidónico son un punto de acuerdo importante entre los resultados de metaboloma y transcriptoma (aumento de Gls, etc.). En particular los niveles alterados de serina y triptófano, entre otros metabolitos, se han asociado con inflamación y estrés oxidativo en el sistema nervioso, una característica que podría surgir del aumento del catabolismo de aminoácidos y también es sugerida por las alteraciones del transcriptoma (I. Davis & Liu, 2015; J. W. D. Griffin & Bradshaw, 2017; Hajsl et al., 2020; K. Y. Kim et al., 2019; Tefera & Borges, 2018; Waagepetersen et al., 2009). El metabolismo del ácido araquidónico (AA) produce prostaglandinas y otros mediadores pro-inflamatorios, siendo otra alteración importante sugerida por los presentes resultados (tabla 1, figura 40). Los metabolitos anotados incluyen ácido eicosapentaenoico, leucotrieno A4 y tromboxano B2, entre otros (ver Apéndice 1.2). La neuroinflamación puede tener efectos tanto positivos como negativos, y se han descrito posibles efectos neuroprotectores de ciertos metabolitos del AA a través de la activación de la cascada PPARgamma (Sambra et al., 2021; L. Sun et al., 2015; Z. J. Wang et al., 2006). Por otro lado, se han observado alteraciones en esta cascada en la EA y se han descrito efectos perjudiciales metabolitos asociados en modelos de ratón de la enfermedad (Amtul et al., 2012; M. H. Thomas & Olivier, 2016). Además de los metabolitos detectados, los resultados de transcriptómica indican la perturbación de las enzimas Ptgis y Ptgs2 (Cox-2), entre otras, lo que respalda un aumento en la producción de algunos de estos mediadores.

Nuestros resultados también sugieren una disminución en los metabolitos protectores carnitina y taurina. Si bien no pude descartarse la existencia de efectos duales, como de algunos metabolitos del ácido araquidónico, estos cambios sugieren la adquisición de un fenotipo nocivo así como la perdida de funciones protectoras por los astrocitos Tg.Old. La carnitina es un aminoácido que transfiere ácidos grasos de cadena larga a la matriz mitocondrial para su β-oxidación, produciendo acetil-CoA que luego ingresa al ciclo TCA (*tricarboxylic acid*). Ayuda a reducir el estrés oxidativo evitando la acumulación de metabolitos tóxicos de acil-CoA de cadena larga (Derous et al., 2018). La disminución de carnitinas y genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos se ha asociado con el envejecimiento en humanos, ratones y otros modelos animales (Derous et al., 2018; Gómez et al., 2012; Hoffman et al., 2014; Houtkooper et al., 2011). Los estudios de población han relacionado la disminución de la carnitina con un mayor riesgo de disminución de la memoria y enfermedad de Alzheimer (Hajjar et al., 2020; Lodeiro et al., 2014). En este sentido, la suplementación con carnitinas podría tener efectos beneficiosos sobre la senescencia (Noland et al., 2009). La taurina se ha asociado con una serie de funciones, incluido

el metabolismo energético, el estrés del ER, la neuromodulación y la homeostasis del calcio, para las cuales se ha propuesto un potencial terapéutico (Schaffer & Kim, 2018).

Otras anotaciones de confianza alta indican una disminución neta de los intermediarios del ciclo TCA malato y lactato (piruvato puede anotarse pero con una puntuación de confianza baja). Los resultados precedentes de transcriptómica sugerían una mayor participación de la ruta de las pentosas fosfato (PPP) en detrimento de la glucólisis, un ajuste del ciclo del ácido cítrico (Ldha al alza, Ldhb a la baja) como mecanismo compensatorio, glutaminolisis y alteraciones de la función mitocondrial. Si bien no es una anotación prioritaria los resultados de metabolómica también sugieren un aumento de uno de los metabolitos de la PPP (fosforribosilo pirofosfato, ver Apéndice 1.2.1). Sin embargo, basados en alteraciones similares en otros tipos celulares y células malignas, es inesperado encontrar una reducción de metabolitos como lactato (Chinchore et al., 2017; Valvona et al., 2016; Z. H. Wang et al., 2021). Esto puede implicar un aumento del consumo anabólico, o una mayor actividad mitocondrial. Estudios funcionales adicionales deben realizarse para resolver estos conflictos.

VI. ESTUDIO DE ESTRATEGIAS PARA REVERTIR EL FENOTIPO NEUROTÓXICO ASTROCITARIO

En este capítulo nos centramos en la exploración de estrategias farmacológicas para revertir el fenotipo de los astrocitos Tg.Old y/o complementariamente prevenir el daño neuronal ocasionado por su medio condicionado como una posible alternativa terapéutica para retrasar la aparición o prevenir la progresión de la EA.

A continuación, detallamos los diversos tipos de tratamientos para la EA, tanto en uso como experimentales, seguido de una reseña de la estrategia experimental utilizada para cumplir con nuestro objetivo. Posteriormente, presentamos los resultados obtenidos y su discusión.

Estas actividades específicas y otras complementarias en la búsqueda del efecto neuroprotector de los compuestos analizados, fueron realizadas en colaboración dentro del marco del proyecto de Posdoctorado de la Dra. Daniela Santi, llevado a cabo en el áera I+D Biomédica de CUDIM durante el periódo 2019-2021 (ANII PD_NAC_2018_1_149726). Gracias a esta instancia posdoctoral se logró evaluar el efecto neuroprotector de una serie de flavonoides novedosos aislados de las especies vegetales *Dalea elegans* y *Dalea pazensis*, por la Dra. Santi y colaboradores de la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina) (Peralta et al., 2014; Santi et al., 2017). El aporte particular del tesista a esta investigación estuvo dada por el estudio *in silico* de la interacción de varias de las flavanonas con la enzima GSK-3β, uno de sus potenciales blancos de acción en la neurona.

Los resultados obtenidos forman parte del manuscrito de (Santi et al. 2023) preparado para su publicación en una revistra arbitrada y donde compartimos primera autoria. El mismo se agrega adjunto en el Apéndice 3 de esta tesis. En ese material pueden encontrarse mayores detalles de metodología, resultados y ejemplos asociados.

Asimismo, este trabajo también tiene como antecedente principal la publicación de (Santi et al., 2020) (adjunta en el Anexo 1.2 de la tesis). Dicho trabajo se enmarcó en anteriores estudios de postdoctorado de la Dra. Santi realizados en colaboración entre el IIBCE y CUDIM (CONICET, Argentina, 2017-2019). Entre otras actividades, esa publicación evaluó la capacidad neuroprotectora de varias flavanonas preniladas sobre un modelo de cultivo primario neuronal sometido a un insulto oxidativo, así como estudios de actividad *in vitro* e *in silico* para determinar posibles blancos de acción.

1. Fundamento teórico: tratamientos para la EA

1.1. Tratamiento alopático

Los fármacos actuales para el tratamiento de la EA incluyen inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) (donepezilo, rivastigmina y galantamina) y antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), concretamente memantina (Bullock, 2006; C. W. Ritchie et al., 2004). Estos medicamentos pueden provocar efectos secundarios adversos y beneficios limitados. Mejoran la función cognitiva o enlentecen su deterioro a través del aumento del nivel de acetilcolina o el bloqueo del receptor glutamatérgico, respectivamente. Otras alternativas propuestas para el tratamiento sintomático de la enfermedad incluían la activación del receptor de acetilcolina nicotínico neuronal (ABT-418), el antagonismo del receptor GABAB (SGS-742) y la modulación serotoninérgica (Lu AE58054). Sin embargo, no fueron lo suficientemente eficaces en ensayos clínicos (Froestl et al., 2004; Potter et al., 1999).

Actualmente existen varias líneas de investigación para el desarrollo de nuevos tratamientos para la EA, incluyendo estrategias para remediar la patología Aβ, tau o procesos inflamatorios según se describen a continuación (revisado en (Awasthi et al., 2016; G. F. Chen et al., 2017; Jia et al., 2014; C. Li & Götz, 2017; M. Medina, 2018; Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020)).

1.2. Terapias dirigidas a la patología amiloide y tau

Varios inhibidores de las β y γ secretasas así como activadores de la α-secretasa dirigidos contra la producción de Aβ y la formación de placa amiloidea son candidatos prometedores (revisado en (Awasthi et al., 2016; G. F. Chen et al., 2017)). En modelos de ratones transgénicos de la EA, inhibidores de la β-secretasa 1 (BACE1) fueron capaces de disminuir el contenido de Aβ cerebral y mejorar la cognición (revisado en (A. K. Ghosh & Osswald, 2014)). Semagacestat (LY450139, Eli Lilly) fue un candidato prometedor dirigido a la inhibición de la γ-secretasa (Henley et al., 2009), y probado en ensayos clínicos aunque mostró una eficacia insuficiente. Otro desafío importante es reducir el desarrollo de efectos adversos, debido al rol fisiológico de estas proteasas fuera de la cascada amiloide.

Además del corte por las enzimas β y γ secretasas, la APP puede ser procesada por la α-secretasa, generando un fragmento C-terminal más largo (sAPP) y previniendo la generación de monómeros Aβ. La activación de α-secretasa es entonces un enfoque posible para disminuir la producción de Aβ y proteger las neuronas de sus posibles efectos nocivos. Activadores de la proteína quinasa C, agonistas de los receptores muscarínicos, de glutamato y de serotonina así como estatinas, estrógenos y la testosterona se han asociado a la activación de esta enzima (más detalles en (Jia et al., 2014)).

Se han desarrollado también estrategias de inmunización activa y pasiva para eliminar el Aβ monomérico y agregado y para prevenir la generación de estos agregados (revisado in (Awasthi et al., 2016; Panza et al., 2012; Donna M. Wilcock & Colton, 2008)). Estudios de inmunización activa en modelos animales mostraron efectos beneficiosos, como reducción de la carga de Aβ en el cerebro, prevención de la pérdida de memoria y mejora de la función cognitiva (P. Das et al., 2003; Dodart et al., 2002; Schenk et al., 1999; Donna M. Wilcock et al., 2009). Evidencia en ratones 3xTg-AD muestra que la inmunoterapia contra Aβ además de reducir las placas y la acumulación de Aβ intracelular, resulta en la

ausencia de patología tau temprana (Oddo et al., 2004). Un estudio preliminar de inmunización activa en pacientes humanos obtuvo resultados prometedores de reducción de la carga de placa y beneficio cognitivo (reseñado en (Bayer et al., 2005)). Desafortunadamente, los ensayos clínicos no lograron replicar estos efectos y mostraron efectos secundarios inmunológicos que incluyen meningoencefalitis, microhemorragias y edema vasogénico (Holmes et al., 2008; Orgogozo et al., 2003; Panza et al., 2012). Estas observaciones han llevado a la prohibición de realizar más pruebas de muchas vacunas en los ensayos clínicos. En este sentido, se ha ideado un enfoque alternativo que implica la administración directa de anticuerpos para evitar la respuesta inmune. Esta estrategia de inmunización pasiva ayuda en la eliminación eficiente de las placas amiloides, la reducción de la hiperfosforilación de tau, la prevención de la citopatología neurítica y glial y la interrupción de la plasticidad sináptica en el hipocampo (Bard et al., 2000; DeMattos et al., 2001; Klyubin et al., 2005). Recientemente se han avalado en Estados Unidos por parte de su agencia reguladora FDA (*Food and Drug Administration*) el uso de Aducanumab y Lecanemab, anticuerpos dirigidos a Aβ, para el tratamiento precoz de la EA en algunos grupos de pacientes. Esto ha significado una controversia importante debido a la falta de evidencias sobre su efectividad y notable presencia de efectos adversos graves (Day et al., 2021; Mahase, 2021a, 2021b, 2021c; Prillaman, 2022; Reardon, 2023; The Lancet, 2022; van Dyck et al., 2022). Lecanemab ha mostrado efectos prometedores, en particular cierta reducción en la tasa de progresión de la enfermedad, aunque estos resultados no son definitivos y, sobre todo, pueden no ser clínicamente relevantes, por lo que deben tomarse con precaución (Swanson et al., 2021; The Lancet, 2022).

Una tercera estrategia se dirige a la prevención de la agregación de monómeros de Aβ así como a fomentar su desintegración (revisado en (Awasthi et al., 2016)) lo que incluye compuestos antiaglomerantes, agentes complejantes de metales y algunos receptores de superficie celular que alteran la formación de fibrillas o placas de Aβ. Curcumina y otros compuestos, por ejemplo, tienen efectos antiamiloidogénicos (Nakagami et al., 2002; Rivera-Marrero et al., 2020; F. Yang et al., 2005).

Varias estrategias diferentes dirigidas a la patogénesis dependiente de tau se están estudiando (revisado en (C. Li & Götz, 2017; M. Medina, 2018)) tal como la reducción del nivel de tau, la prevención de la hiperfosforilación de tau y la inhibición de su agregación. Muchas investigaciones se han centrado en prevenir la hiperfosforilación de tau, evento anterior que causa el desprendimiento de esta proteína de los microtúbulos. Algunos de los blancos involucrados son GSK-3β, CDK5 y PP2A (proteína fosfatasa 2A) siendo GSK-3β uno de los más estudiados (M. Medina & Avila, 2013). Se ha evidenciado por ejemplo la inhibición de esta quinasa por el litio así como cafeína en estudios preclínicos y clínicos (Arendash et al., 2009; Hampel et al., 2009; Noble et al., 2005).

Otras estrategias dirigidas a impedir la formación de ovillos incluyen inhibir la agregación de tau o promover la disociación de su ensamblaje. La epotilona D, la nicotinamida y otros compuestos han mostrado efectos preclínicos favorables (K. N. Green et al., 2008; Jia et al., 2014; B. Zhang et al., 2012). Asimismo, varios polifenoles y fenotiazinas son potenciales inhibidores de su agregación (A. Crowe et al., 2009; Taniguchi et al., 2005). Más recientemente, varias estrategias de inmunoterapia anti-tau también se han probado con éxito en modelos animales, lo que sugiere que esta podría ser una opción factible para eliminar especies de proteínas tóxicas en tauopatías, EA y trastornos relacionados (Pedersen & Sigurdsson, 2015).

1.3. Estrategias antiinflamatorias

Algunos estudios epidemiológicos sugieren a los inhibidores de la enzima ciclooxigenasa (antiinflamatorios no esteroideos, AINE) como agentes protectores contra la EA (J. C. S. Breitner & Zandi, 2009; in 't Veld et al., 2001; Vlad et al., 2008; Weggen et al., 2001). Existe sin embargo evidencia contradictoria al respecto. Por un lado, varios ensayos clínicos con diferentes tipos de AINE no pudieron detectar efectos beneficiosos (Aisen et al., 2003; de Jong et al., 2008; R. C. Green et al., 2009; Lyketsos et al., 2007; Martin et al., 2008; Eliezer Masliah et al., 1992; Pasqualetti et al., 2013; Reines et al., 2004; Scharf et al., 1999). Por otro lado, en un amplio estudio de prevención, los participantes mostraron una mejoría cognitiva durante un período prolongado después de finalizar el tratamiento con este tipo de compuestos, por lo que la efectividad de esta estrategia no es concluyente (J. C. Breitner et al., 2011). Asimismo, se han observado efectos protectores de este tipo de compuestos en modelos animales, que podrían estar mediados a nivel del procesamiento de APP, por inhibición del inflamasoma NLRP3, etc. (Daniels et al., 2016; Jantzen et al., 2002; Weggen et al., 2001; Woodling et al., 2016; Yan et al., 2003). Sorprendentemente, algunos compuestos como ibuprofeno e indometacina, redujeron la producción de Aβ sin afectar otros sustratos como Notch (Weggen et al., 2001). A pesar de estos resultados no concluyentes y contradictorios informados, los compuestos antiinflamatorios continúan estudiándose como potenciales tratamientos.

El TNF-α es uno de los blancos antiinflamatorios más interesantes. En pacientes con EA, el TNF-α no solo se localiza junto con las placas de Aβ en el cerebro, sino que sus niveles también están elevados en el plasma y el líquido cefalorraquídeo y se correlacionan con la gravedad de la enfermedad (Steeland et al., 2018). Para el tratamiento de varias afecciones inflamatorias periféricas se han desarrollado anticuerpos monoclonales específicos contra el TNF-α (infliximab, adalimumab) y proteínas de fusión recombinantes (etanercept) (Lapadula et al., 2014). Al respecto, los pacientes con trastornos reumáticos que reciben tratamiento con bloqueadores del TNF-α tienen un menor riesgo de desarrollar EA (Zhou et al., 2020). Varios tratamientos potenciales han demostrado efectos beneficiosos en modelos animales, tales como reducción del depósito de placa, reducción de la activación de la microglía, mejora de la función sináptica, y mejora de las funciones cognitivas (Cavanagh et al., 2016; MacPherson et al., 2017; McAlpine et al., 2009; J. I. A. E. Park et al., 2019; Sama et al., 2012). Una limitante de estos tratamientos es que no pueden cruzar fácilmente la BHE (Chang et al., 2017; Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020). Otra estrategia es el desarrollo de inhibidores de la síntesis de TNF-α (Belarbi et al., 2012). Derivados de la talidomida como la 3,60-ditiotalidomida (3,60-DT), también conocidos como imidas inmunomoduladoras (IMiD), son compuestos prometedores con una mejor permeabilidad de la BHE en comparación con antiinflamatorios similares (Jung et al., 2019). En modelos animales se han reportado un variedad de efectos incluyendo anti-inflamatorios y neuroprotectores, reducción de la generación de Aβ y la activación de astrocitos y microglia, así como mejora en la memoria (Decourt et al., 2020; Gabbita et al., 2012; Jung et al., 2019; Lin et al., 2020; I. Russo et al., 2012; Tian et al., 2019; Tweedie et al., 2012).

El inflamasoma NLRP3 ha sido asociado a la neuroinflamación y deterioro cognitivo relacionado con el envejecimiento, siendo entonces considerando como un potencial blanco terapéutico para enfermedades inflamatorias (El-Sharkawy et al., 2020; Goldberg & Dixit, 2015; H. Jiang et al., 2020; D.

Zheng et al., 2020). Evidencia en un modelo murino de la EA muestra que MCC950, un inhibidor de NLRP3, promueve la eliminación microglial de Aβ, reduce su acumulación y mejora la función cognitiva (Coll et al., 2019; Dempsey et al., 2017; M. Jiang et al., 2020).

Los receptores de adenosina 2A (A2AR) son un blanco antiinflamatorio prometedor. La inactivación genética o farmacológica de estos receptores con una reducción de la fosforilación de tau en varios modelos murinos (C. Laurent et al., 2014; Z. A. Zhao et al., 2017). Los antagonistas del receptor de adenosina A2A son protectores en un modelo de isquemia-reperfusión (Mohamed et al., 2016). Asimismo evidencia *in vitro* muestra que algunos antagonistas podrían prevenir la muerte neuronal inducida por exposición a Aβ (Dall'Igna et al., 2003).

Varias otras estrategias y blancos celulares relacionados a la inflamación están siendo estudiados. Por ejemplo, los inhibidores de MAO se han asociado a efectos antioxidantes, antiinflamatorios y sobre la producción de neurotransmisores por lo que son un potencial tratamiento para diferentes trastornos neuropsiquiátricos (revisado en (Behl et al., 2021; Manzoor & Hoda, 2020; Youdim & Weinstock, 2004)). El control de la sobreproducción de NO con fitoquímicos y nutracéuticos, y la inhibición selectiva de iNOS se han estudiado como posibles tratamientos modificadores para la enfermedad de Parkinson (EP), la EA, la esclerosis múltiple y otros trastornos inflamatorios (Minhas et al., 2020; Subedi et al., 2021).

Estrategias dirigidas a reducir la expresión de ciertas interleuquinas tal como IL-1β, IL-12/IL-23 han mostrado efectos beneficiosos en modelos animales y/o en pacientes con la enfermedad (J. Alam et al., 2017; J. J. Alam, 2015; Teng et al., 2015; J. Vom Berg et al., 2012). Si bien todos los blancos mencionados se asocian directa o indirectamente a la actividad de astrocitos y microglia, regular más específicamente estos tipos celulares es otra estrategia considerada, por ejemplo atenuando la reactividad astroglial (Porrini et al., 2015; Q. Yang et al., 2011).

1.4. Tratamientos de reposicionamiento: tratamientos anticancerígenos, tratamientos antidiabéticos

Varios mecanismos fisiológicos y patológicos confirman la conexión entre la neurodegeneración y la carcinogénesis. Estudios epidemiológicos indican que tanto la EA como la EP son menos comunes en pacientes con ciertos tipos de cáncer (Ganguli, 2015). Las principales vías de señalización investigadas en la patogénesis del cáncer tienen vínculos notables con las enfermedades neurodegenerativas tal como p53, cuya expresión puede encontrarse aumentada en la EA (Ariga, 2015; Checler & Alves Da Costa, 2014; Lanni et al., 2012).

Se han realizado algunos estudios para evaluar el potencial de diferentes fármacos contra el cáncer para el tratamiento de la EA tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, agonistas del receptor retinoide X (RXR) (Fukasawa et al., 2012) han mostrado propiedades neuroprotectoras. Varios inhibidores de proteínas quinasas han mostrado efectos beneficiosos tanto *in vitro* como en modelos animales (Bellozi et al., 2016, 2019; Trias et al., 2016; Turner et al., 2020). El tratamiento con nilotinib por ejemplo, un inhibidor de la tirosina quinasa c-Abl utilizado para el tratamiento de leucemia (Ursan et al., 2015), ha mostrado una mejora en el depósito de amiloide y una atenuación de la pérdida de

volumen del hipocampo en pacientes con la enfermedad (Turner et al., 2020). Aunque el mecanismo molecular preciso no se conoce, este involucraría la inducción de autofagia.

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es otra enfermedad vinculada a la EA según se detalló previamente (De La Monte et al., 2006). Al respecto, la administración intranasal de insulina ha mostrado un efecto de mejora de la función cognitiva en pacientes con EA (Craft et al., 2012). De manera similar, análogos del GLP-1 (*Glucagon-like peptide*) han mostrado efectos neuroprotectores en modelos animales (Bomfim et al., 2012; Hölscher, 2014; McClean & Hölscher, 2014). Si bien no se conoce su mecanismo de acción, los agonistas del receptor de GLP-1 se han indicado también como posibles agentes neuroprotectores para trastornos neurológicos como la EP y la isquemia (Athauda & Foltynie, 2016; Meier, 2012; Rachmany et al., 2013; Teramoto et al., 2011). Curiosamente NLY01, un agonista de GLP1R desarrollado para combatir la inflamación en la diabetes, resultó protector en un modelo murino de EP así como en un modelo de glaucoma posiblemente al limitar la liberación de citoquinas microgliales y la aparición de astrocitos con un perfil semejante al tipo A1 (Sterling et al., 2020; Yun et al., 2018).

La metformina es un medicamento sensibilizante a la insulina, utilizado en el tratamiento de la DM2 (Y. W. Wang et al., 2017). Evidencia *in vitro* indica que puede reducir algunas alteraciones asociadas a la EA como la fosforilación de tau y el aumento de Aβ (Gupta et al., 2011). También puede mejorar la autofagia y la función mitocondrial y aliviar la inflamación asociada con el envejecimiento (Bharath et al., 2020). En el modelo *Caenorhabditis elegans* se ha evidenciado que puede aumentar la esperanza de vida (Onken & Driscoll, 2010). Varios otros medicamentos que mejoran el metabolismo de la glucosa, dirigidos a diversos blancos como el receptor nuclear PPARγ están siendo estudiados (Colca et al., 2013; Divakaruni et al., 2013; Jia et al., 2014; Mcclean et al., 2011). PPARγ funciona como un factor de transcripción que modula la respuesta inflamatoria, promueve la endocitosis de Aβ mediada por microglía y disminuye la secreción de citoquinas (Mandrekar-Colucci et al., 2012). PPARγ también puede inhibir la β-secretasa y promover la ubiquitinación para degradar la carga de amiloide (Landreth et al., 2008). RAGE es otro posible blanco, siendo estudiado clínicamente (J. Cummings et al., 2021). Este receptor se une a productos de glicosilación que se acumulan durante el envejecimiento, diabetes, y otras patologías asociadas al estrés oxidativo promoviendo la generación de especies reactivas (Rungratanawanich et al., 2021). RAGE puede unirse también a Aβ y es sobre-expresado por astrocitos y microglia en la EA (Lue et al., 2001).

Alteraciones metabólicas presentes en el cáncer como en la ruta de las pentosas fosfato también se han asociado con la neuroinflamación, lo que podría aprovecharse en el reposicionamiento de inhibidores de G6PDH, una de las enzimas clave (Arbe et al., 2020; Tu et al., 2019; H. C. Yang et al., 2019). Dicloroacetato (DCA), un fármaco propuesto para el cáncer dirigido a la mitocondria, también se ha explorado *in vivo* en un modelo de ELA en rata (Martínez-Palma et al., 2019; Tataranni & Piccoli, 2019). Otros medicamentos propuestos para el cáncer o la diabetes dirigidos al estrés del retículo son alternativas potenciales para la EA (R. Ghosh et al., 2014; Schmitz et al., 2018; Yadav et al., 2014; Hui Zhang et al., 2013). Algunos compuestos han mostrado resultados positivos *in vitro* o *in vivo* (M. He et al., 2019; Mercado et al., 2018).

1.5. Productos naturales, estrategias multidiana y neuroprotectoras

Múltiples evidencias indican que los flavonoides y otros compuestos relacionados pueden ejercer efectos beneficiosos sobre procesos neuronales destacándose efectos antioxidantes, antiinflamatorios y neuroprotectores (Hole & Williams, 2020; J. P. E. E. Spencer, 2007). Se destaca que muchos de estos compuestos (quercetina, catequina, flavonoides prenilados, etc.) han sido evaluados en modelos animales mostrando efectos positivos sobre blancos asociados a la EA (Arredondo et al., 2010; Calfio et al., 2020; J. K. Cho et al., 2011; Hole & Williams, 2020; Jalili-Baleh et al., 2018; D. C. Kim et al., 2016; S. Y. Park et al., 2016; Santi et al., 2020). El tratamiento con quercetina, por ejemplo, ha logrado mejoras cognitivas y en la patología del modelo 3xTg-AD (Sabogal-Guáqueta et al., 2015).

Potenciales sitios de unión para estas moléculas en el sistema nervioso incluyen receptores de adenosina, TrkB, estrógenos, opiáceos, etc. (Fernandez et al., 2010; Hanrahan et al., 2011; Jang et al., 2010; X. D. Ji et al., 1996; Katavic et al., 2007; B. H. Lee et al., 2010; Nifli et al., 2005). Asimismo estos compuestos son capaces de interactuar con un gran número de proteína quinasa pertenecientes a las rutas de PI3K/Akt, MAPK, NF-κB, etc. (Goyarzu et al., 2013; Hole & Williams, 2020; J. P. E. Spencer et al., 2003; J. P. E. E. Spencer, 2007). Por ejemplo, la acción antiinflamatoria de varios compuestos se ha asociado a la inhibición de receptores tipo Toll (Hussein et al., 2015; Jiwrajka et al., 2016; Rahimifard et al., 2017; Seong et al., 2015; T. Zhang et al., 2015). La inhibición del eje GSK-3β/tau es otro mecanismo propuesto de protección de acuerdo a evidencia *in vitro* así como en modelos animales (E. J. Gong et al., 2011; Qin et al., 2013; Rezai-Zadeh et al., 2009; Sawmiller et al., 2016). El flavonoide morina, por ejemplo, es capaz de inhibir la actividad de GSK-3β, prevenir la fosforilación de tau y la neurotoxicidad por Aβ *in vitro* (E. J. Gong et al., 2011). En un modelo murino de la enfermedad el tratamiento con luteolina disminuyó los niveles de Aβ y redujo la actividad de la enzima (Rezai-Zadeh et al., 2009). Otro flavonoide, cianidina 3-O-glucosido moduló la ruta GSK-3β/tau y previno el déficit cognitivo inducido por el tratamiento con Aβ en ratas (Qin et al., 2013).

Las rutas de Nrf2 y sirtuinas son blancos de flavonoides y compuestos relacionados especialmente relevantes por su rol como respuestas de estrés, con efectos antioxidantes y sobre el funcionamiento mitocondrial, entre otros (Jiao & Gong, 2020; Singh et al., 2021; Villavicencio Tejo & Quintanilla, 2021; S. Y. Wong & Tang, 2016). Resveratrol, por ejemplo, es uno de los compuestos mejor conocidos por su acción activadora sobre Sirt1, asociada a su efecto beneficioso sobre el envejecimiento (Marchal et al., 2013; Quadros Gomes et al., 2018). Efectos antioxidantes, antiinflamatorios y neuroprotectores se han evidenciado *in vitro* así como en modelos animales (Quadros Gomes et al., 2018). Asimismo, algunos estudios clínicos muestran beneficios cognitivos en personas de edad avanzada (Evans et al., 2017; Veronica Witte et al., 2014).

Algunas evidencias indican también que ciertos flavonoides tienen efectos anti-amiloidogénicos: son capaces de interrumpir la fibrilación de Aβ, funcionan como inhibidores de BACE-1 o actúan mejorando la actividad de ADAM10 (revisado en (Baptista et al., 2014; Ono et al., 2003)). Por ejemplo, el flavonoide epigalocatequina-3-galato (EGCg) tiene propiedades antiagregantes y promueve la activación de α-secretasa (Bieschke et al., 2010; Ehrnhoefer et al., 2008; Obregon et al., 2006; Rezai-Zadeh et al., 2005,

2008). Asimismo se ha evidenciado su efecto positive sobre la cognición en modelos animales (Rezai-Zadeh et al., 2008).

1.6. Senolíticos

Las células senescentes secretan citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y proteasas, que pueden impactar negativamente el microambiente circundante, acelerar el envejecimiento y promover la aparición de enfermedades relacionadas con la edad (Baker & Petersen, 2018; James L. Kirkland & Tchkonia, 2017). Los senolíticos son compuestos dirigidos a eliminar selectivamente células senescentes y potencialmente proporcionar efectos beneficiosos para el envejecimiento y patologías asociadas (Baker & Petersen, 2018; Birch & Gil, 2020; J. L. Kirkland & Tchkonia, 2020; James L. Kirkland & Tchkonia, 2017; P. Zhang et al., 2019). La combinación de dasatinib y quercetina se ha estudiado como tratamiento senolítico en modelos de ratón logrando efectos beneficiosos (Musi et al., 2018; Novais et al., 2021; Saccon et al., 2021; P. Zhang et al., 2019). Dasatinib es un inhibidor de la tirosina quinasa con permeabilidad de la BHE; disminuye las respuestas neuroinflamatorias microgliales y astrocíticas actuando, por ejemplo, en el receptor TLR4 (Ryu et al., 2019). Como se mencionó anteriormente, quercetina es un flavonoide natural asociado a múltiples efectos neuroprotectores (Hole & Williams, 2020; Sabogal-Guáqueta et al., 2015). En particular, el tratamiento intermitente de un modelo transgénico de la EA en edad avanzada resultó en una reducción del número de neuronas con ovillos tau, aumento de marcadores neuronales y disminución del agrandamiento ventricular (Musi et al., 2018). En otros modelos, el tratamiento con esta combinación se asoció con una remoción de células de tipo senescente, reducción de la neuroinflamación, activación microglial y tamaño de placa, así como mejoras cognitivas (P. Zhang et al., 2019). Curiosamente el tratamiento con esta combinación también se asocia con alteraciones en la composición de la microbiota intestinal (Novais et al., 2021; Saccon et al., 2021). La fisetina es otro flavonoide con propiedades senolíticas que ha mostrado mejoras cognitivas en modelos animales (Elsallabi et al., 2022; Yousefzadeh et al., 2018; Y. Zhu et al., 2017).

1.7. Estrategias complementarias

La EA es influida por múltiples factores de riesgo genéticos y ambientales (Reitz et al., 2011). Por ejemplo, algunas evidencias sugieren que ejercicio de resistencia es protector contra la enfermedad (De la Rosa et al., 2020; E. B. Kang et al., 2016; J. Park et al., 2020). El ejercicio mejora la función mitocondrial, lo que mitigaría la neurotoxicidad inducida por las especies reactivas además de favorecer vías antiinflamatorias (Intlekofer & Cotman, 2013; Nilsson et al., 2019; Onyango et al., 2010; Radak et al., 2016). La restricción calórica es otro fenómeno relacionado. Se ha evidenciado que mejora el metabolismo de los lípidos y la glucosa, atenúa la inflamación y mejora la salud cardiovascular (Dorling et al., 2020; Hwangbo et al., 2020; Van Cauwenberghe et al., 2016), logrando efectos beneficiosos sobre la memoria y así como una extensión de la esperanza de vida. Esto sucedería posiblemente a través de la acción de factores como Nrf2 y sirtunas que reducen la producción de especies reactivas y pueden atenuar rutas proinflamatorias durante el envejecimiento (revisado en (Chung et al., 2001; Francesco et al., 2018; Hwangbo et al., 2020)).

Reportes de menor incidencia de EA (Wolozin et al., 2000) y reducción de la patología en ratones modelo (Refolo et al., 2001) tras el uso constante de fármacos reductores del colesterol como las estatinas,

apoyan su uso en el tratamiento de la enfermedad. Estudios en animales indican también que las dietas ricas en colesterol promueven la patología Aβ (Sparks et al., 2000). Estos efectos se atribuyen a la influencia del colesterol sobre las enzimas secretasas ubicadas en la membrana (S. Wahrle et al., 2002). Suplementos dietéticos con una relación apropiada de omega 3/omega 6 y bajo contenido de colesterol también pueden considerarse una estrategia en la prevención (Corsinovi et al., 2011).

Algunas evidencias sugieren que alteraciones en la microbiota intestinal se asocian con efectos pro-inflamatorios que podrían fomentar la aparición de enfermedades neurodegenerativas a través del llamado eje intestino-cerebro (Angelucci et al., 2019; Haran et al., 2019; Y. He et al., 2020). En este sentido, el uso de probióticos es otra posible estrategia terapéutica para la enfermedad (Bonfili et al., 2021; Kesika et al., 2021; S. Liu et al., 2020; Shabbir et al., 2021; F. Zhu et al., 2020). Por ejemplo, se han realizado algunos estudios con individuos ancianos mostrando efectos beneficiosos sobre la función inmunitaria (H. Dong et al., 2013; H. S. Gill et al., 2001; Man et al., 2020; Vulevic et al., 2008).

Terapias complementarias con suplementos vitamínicos o nutricionales, tales como carnitina y zinc o con nuevos compuestos, han sido propuestas gracias a su asociación con efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Calfio et al., 2020; Q. Jiang et al., 2020; Onyango et al., 2021; Sadhukhan et al., 2018). La aromaterapia y el uso de aceites esenciales, son terapias no farmacológicas complementarias que han mostrado algunos beneficios cognitivos en pacientes con EA (Forrester et al., 2014; Jimbo et al., 2009).

2. Estrategia experimental (neuroprotección por flavanonas preniladas)

En el marco de los proyectos de Posdoctorado de la Dra. Santi, pudimos contar con una serie de novedosos flavonoides aislados de dos especies del género *Dalea*, *D. elegans* Gillies ex Hook. & Arn. y *D. pazensis* Rusby, por parte de esta investigadora y colaboradores de la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina) (Peralta et al., 2014; Santi et al., 2017). De esa serie de compuestos, se destacan tres flavanonas preniladas (tabla 2) que mostraron un efecto neuroprotector cuando se evaluaron en modelos *in vitro* de neurodegeneración por estrés oxidativo (Santi et al., 2020). Estas fueron seleccionadas para profundizar su estudio por la Dr. Santi junto al resto del grupo de investigación del CUDIM y el IIBCE. Con fines comparativos, se estudió además la flavanona comercial pinocembrina (compuesto 4) (*5,7-dihidroxiflavona*).

Tabla 2. Flavanonas prelinadas de interés obtenidas del género Dalea.

Notación	Nombre	Origen
Compuesto 1 (8PP)	*(-)-(2S)-2',4'-dihidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina*	*Dalea elegans* (raíces y partes aéreas)
Compuesto 2 (Glabranina)	*(-)-(2S)-8-prenilpinocembrina*	*Dalea elegans* (raíces y partes aéreas)
Compuesto 3 (Me8PP)	*(-)-(2S)-4'-hidroxi-2'-metoxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina*	*Dalea pazensis* (raíces)

En esta oportunidad, por un lado, se evaluó la capacidad neuroprotectora de estas flavanonas en el modelo *in vitro* recientemente desarrollado por el equipo de investigación del CUDIM (Diaz-Amarilla et al., 2022). Este paradigma consiste en exponer un cultivo primario de células neuronales (corteza e hipocampo de embriones C57BL/6J — CxH_C57—) al medio condicionado de astrocitos Tg.Old (MCA). Como se menciona en los antecedentes de la tesis, este medio es neurotóxico para estas células. Ocasiona además la activación de la enzima GSK-3β, cambios en el patrón citocromo c y un aumento de la actividad de caspasa 3 que sugieren la activación de la ruta apoptótica intrínseca (Diaz-Amarilla et al., 2022). Este paradigma experimental imitaría el posible entorno neurodegenerativo presente en la EA (Diaz-Amarilla et al., 2022; Hooper et al., 2008; Jope et al., 2011; Stutzmann, 2007).

Para ello, los cultivos neuronales fueron pretratados durante 5 h con cada una de la flavanonas en un rango de 0.001-100 µM (vehículo DMSO, 0.2 % de concentración final) y luego expuestos al MCA durante 24 h a una concentración capaz de inducir 50-70 % de muerte celular. Asimismo se evaluó la toxicidad *per se* de las flavonas bajo el mismo paradigma (sin tratamiento con MCA) para identificar la ventana terapéutica de cada compuesto.

Además de estos análisis, y en relación directa al tercer objetivo de la tesis, se evaluó el efecto de la flavanona con mejor actividad neuroprotectora sobre el cultivo de astrocitos neurotóxicos Tg.Old. En este sentido, revertir el fenotipo astrocitario alterado (efecto citotóxico sobre los astrocitos y/o reducción de la neurotoxicidad del MCA) constituiría un mecanismo beneficioso complementario a la

acción sobre las neuronas. Siguiendo un paradigma similar al descrito para neuronas, los astrocitos Tg.Old se trataron con la flavanona en un rango de 0.01-100 µM durante 24 h, tras lo que se reevaluó la sobrevida celular de los mismos y la neurotoxicidad de su MCA.

Aunque no es un objetivo específico de esta tesis, también comentamos otra de las actividades descritas en la publicación de (Santi et al. 2023). Esta proporciona evidencia sobre el posible mecanismo de acción de las flavanonas preniladas en neuronas primarias, evaluando el efecto de la flavanona con mejor actividad neuroprotectora sobre la vía de fosforilación de la proteína tau. En condiciones patológicas, la proteína tau es hiperfosforilada principalmente por la enzima quinasa GSK-3β, que promueve su agregación en oligómeros. Este proceso puede estar relacionado con la muerte neuronal y la pérdida sináptica presente en la EA (Hernandez et al., 2013; Noble et al., 2003; Strang et al., 2019). En particular, se evaluó la capacidad de la flavanona más activa para inhibir GSK-3β mediante ensayos *in silico* e *in vitro*, así como su efecto sobre la fosforilación de tau (pS199) inducida por MCA.

Los correspondientes ensayos *in silico* permitieron estudiar la unión de las flavanonas de interés a la proteína GSK-3β y se realizaron siguiendo una estrategia de anclaje molecular (*docking*) acoplada a simulaciones de dinámica molecular. Se utilizaron los programas *UCSF Chimera* y *DockingApp* que permiten preparar los archivos de entrada y ejecutar el anclaje con el motor de *AutoDock Vina* (Di Muzio et al., 2017; Pettersen et al., 2004). En primera instancia se realizó un anclaje “a ciegas” para confirmar la unión de la molécula al sitio catalítico. La región definida por estas poses se tomó como referencia para la siguiente tanda de anclaje. Para reducir el sesgo en la selección de poses, se consideraron dos orientaciones alternativas de cada flavanona en el complejo de entre las poses con mejor puntaje de anclaje y presentes consistentemente entre todos los complejos evaluados.

Las simulaciones de dinámica molecular permiten modelar de manera dinámica la interacción entre la proteína y el ligando y derivar varios parámetro de interés como por ejemplo la energía libre de unión o la energía potencial de interacción. La energía libre de unión tiene una correlación directa con la afinidad. Alternativamente, mejores valores de energía potencial sugieren, en principio, mejores valores de afinidad relativa para los distintos compuestos. Se utilizó la aplicación VMD junto al complemento (*plugin*) *QwikMD* para generar los archivos de entrada de la cada simulación, el motor de cálculo NAMD para correr efectivamente estas simulaciones y el *plugin* CaFE para determinar los parámetros energéticos (Humphrey et al., 1996; H. Liu & Hou, 2016; Phillips et al., 2020; Ribeiro et al., 2016). Se establecieron condiciones fisicoquímicas estándar bajo el conjunto (*ensemble*) NpT (isobárico-isotérmico) y considerando además condiciones de solvatación e ionización compatibles con un entorno fisiológico. El protocolo de simulación incluyó una etapa inicial de minimización de energía para optimizar la estructura del sistema, seguido de una etapa de calentamiento para ajustar su temperatura a condiciones fisiológicas, una etapa de equilibración en las condiciones establecidas y una etapa de producción (10 ns). Para el cálculo de energía libre de unión se utilizó el método MM/PBSA a partir de un muestreo de los últimos 3 ns de simulación.

3. Resultados y discusión (neuroprotección por flavanonas preniladas)

3.1. Efecto protector frente a la neurotoxicidad mediada por medio condicionado de astrocitos Tg.Old

En esta sección se evaluó el efecto de flavanonas preniladas (figura 42) de origen natural sobre el fenotipo neurotóxico de los astrocitos Tg.Old y su capacidad de prevenir la muerte inducida por su medio condicionado (MCA) en neuronas primarias.

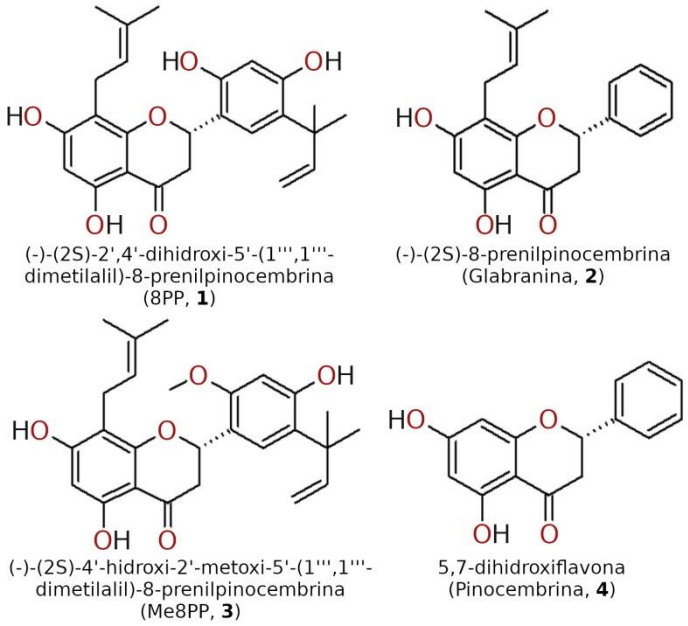


Figura 42. Flavanonas aisladas de raíces y partes aéreas de especies de *Dalea* (1-3) y flavanona comercial pinocembrina (4).

En primera instancia, de los compuestos evaluados, las flavanonas 1 (8PP) y 3 (Me8PP) evidenciaron un efecto neuroprotector en el paradigma de muerte neuronal inducida por tratamiento con MCA (figura 43). En tabla 3 se resumen los parámetros calculados: porcentaje de sobrevida neuronal, concentración efectiva (EC) y concentración letal media (LC_{50}). En particular, se alcanzó hasta un 100 % de sobrevida neuronal con la flavanona 1, y 89 % con la flavanona 3. Las flavanona 2 y pinocembrina resultaron en cambio inactivas. Asimismo, la concentración efectiva de las flavonas protectoras fue de 0.01 µM y de 25 µM para el compuesto 1 y 3 respectivamente. Debe considerarse igualmente un comportamiento bifásico de este efecto, ya que la flavona 1 comienza a ser tóxica a partir de los 2.2 µM (tabla 3). El compuesto 3 no resultó toxico en ninguna de las dosis evaluadas (> 100 µM).

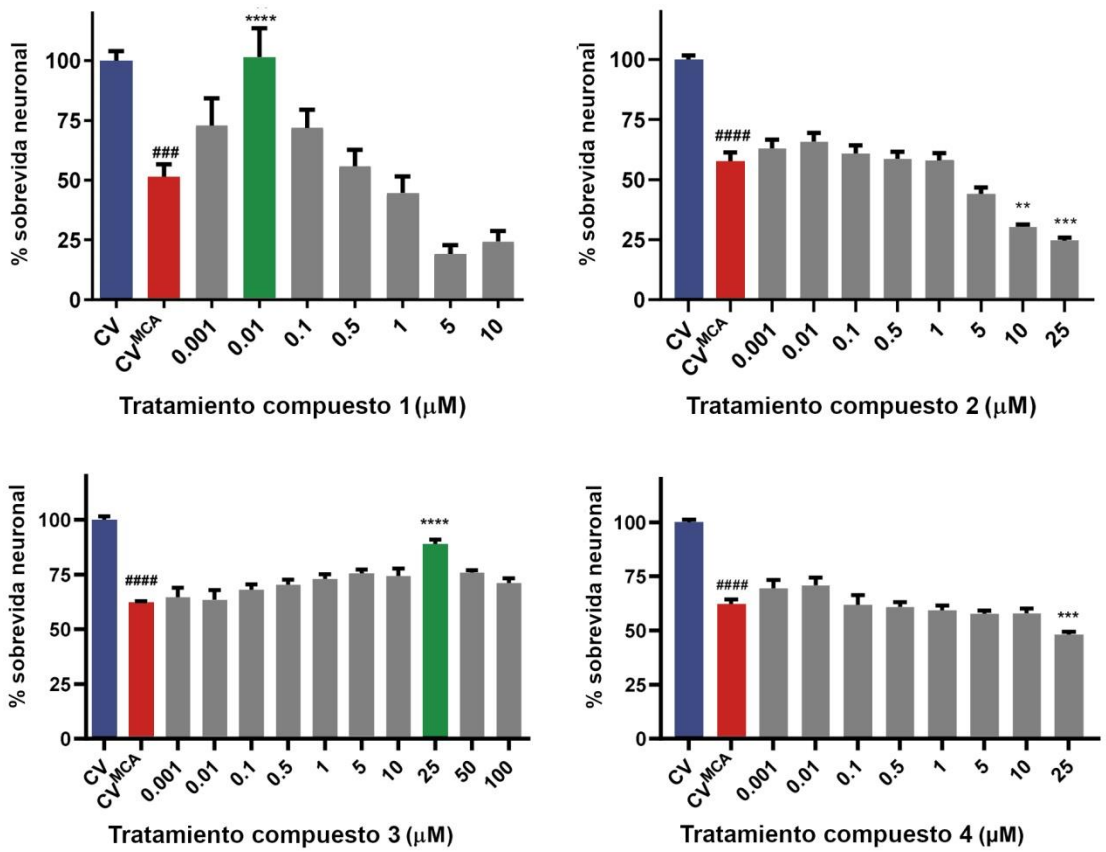


Figura 43. Supervivencia neuronal de células corticales-hipocampales (CxH_C57) tratadas con diferentes flavanonas preniladas, antes de su exposición a MCA de astrocitos Tg.Old. # Estadísticamente diferente con respecto al vehículo de control (CV). * Estadísticamente diferente respecto al control tras lesión con MCA de astrocitos Tg.Old (CV^{MCA}). La supervivencia neuronal se evaluó mediante el ensayo MTT. Los resultados se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples utilizando el programa *GraphPad Prism 6*.

Tabla 3. Neuroprotección de los compuestos 1-4 representada por el porcentaje máximo de supervivencia neuronal después del tratamiento con MCA en cultivos neuronales, EC asociada (*effective concentration*, concentración efectiva) y LC_{50} (*lethal concentration mean*, concentración letal media). La supervivencia neuronal se evaluó mediante el ensayo MTT.

Flavanona	Neuroprotección		Toxicidad
	Sobrevida neuronal (% control)	EC (μM)	LC_{50} (μM)
1	100	0.01	(2.2 ± 0.3)
2	—	—	(25.1 ± 0.6)

3	89	25	> 100
4	—	—	> 25

El análisis estructura-actividad correspondiente sugiere que en estos compuestos, los sustituyentes 5'-dimetilalilo y 4'-hidroxi en el anillo B están asociados a la actividad protectora. Sobre todo, la hidroxilación en anillo B se asociaría a la mayor potencia del compuesto 1 respecto del compuesto 3.

3.2. Evaluación in silico e in vitro de la actividad inhibitoria del compuesto 1 sobre la fosforilación de tau dependiente de GSK-3β

A continuación, se presenta de manera complementaria a los resultados anteriores el estudio del efecto de la flavanona 1 sobre la cascada de fosforilación de tau dependiente de GSK-3β.

En primera instancia, el estudio de la fosforilación de tau inducida por MCA (1.5 h) evidenció que el pretratamiento con la flavanona 1 (0.1 µM) disminuye este efecto en cerca de un 15 %, aunque concentraciones más bajas o más altas dejan de ser efectivas (figura 44).

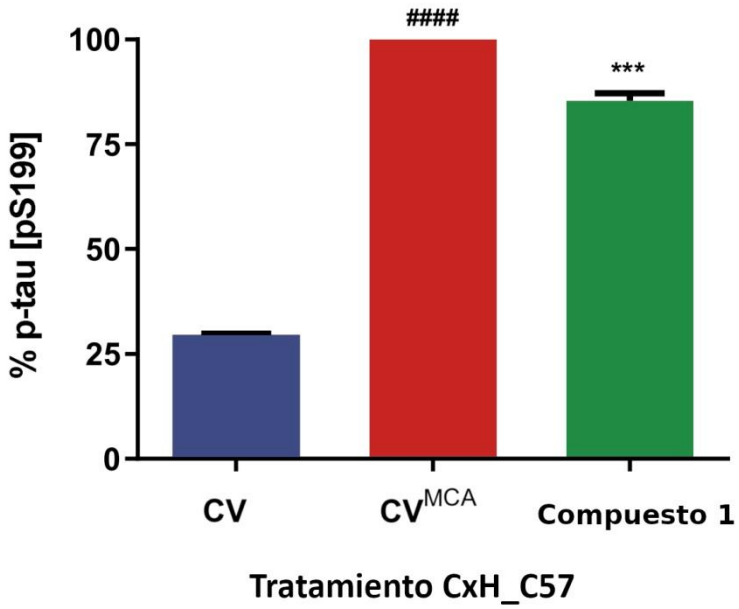


Figura 44. % de tau fosforilada [pS199] en neuronas corticales-hipocampales (CxH_C57). CV: control vehículo. CV_{MCA}: control de neuronas CxH_C57 lesionadas con MCA de astrocitos Tg.Old durante 1.5 h. Compuesto 1: neuronas CxH_C57 pretratadas durante 5 h con el compuesto natural a una concentración de 0.1 µM, y luego lesionadas con MCA de astrocitos Tg.Old durante 1.5 h. ####Estadísticamente diferente con respecto al control vehículo (CV). **Estadísticamente diferente con respecto al control después de la lesión con MCA de astrocitos Tg.Old. La fosforilación de tau se evaluó en extractos de proteínas mediante ensayo ELISA. Los resultados se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples utilizando el programa *GraphPad Prism 6*.

Un posible mecanismo de acción para este efecto sería a través de la inhibición de la enzima GSK-3β. Los estudios de anclaje molecular de la flavanona 1 sobre la enzima humana y murina indican que esta es capaz de interactuar con el sitio catalítico de la enzima (sitio de unión a ATP) a través de puentes de hidrógeno, dados principalmente por el grupo carbonilo 4-O así como los sustituyentes hidroxilo en posición 7-OH, y en menor medida 5-OH y 2'-OH (figura 45, ver Apéndice 1.3 por más ejemplos y detalles). El grupo dimetilalilo del compuesto podría ubicarse en una subcavidad apolar del sitio activo, aunque también pueda ocurrir un re-arreglo del complejo por rotación del anillo B. Asimismo, los valores de energía libre de la interacción de la flavanona en el complejo muestran ser favorables (comparables a otros inhibidores co-cristalizados) y de mayor magnitud que los de las flavanonas menos activas o inactivas (tabla 4).

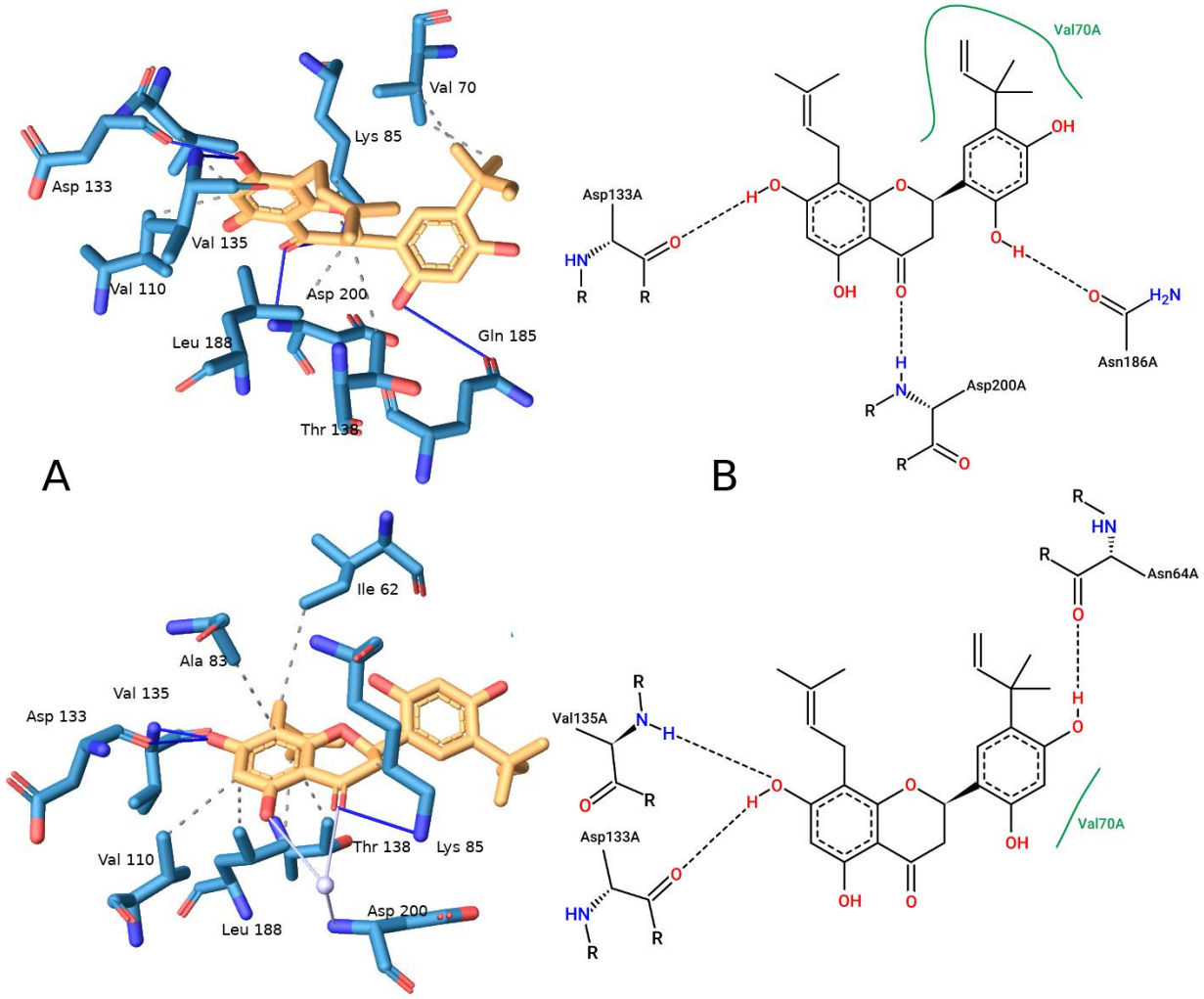


Figura 45. Información de contactos moleculares del compuesto 1 en GSK-3β murina. Estructura cristalina PDB 6ae3. Ver Anexo por más detalles y resultados en estructuras de cristales humanos (material complementario del borrador de manuscrito Santi et. al 2023). Diagramas a la izquierda (A) adaptados del servidor web PLIP (Salentin et al., 2015) y diagramas a la derecha (B) del servidor web ProteinsPlus (Fährrolfes et al., 2017). Se presentan dos poses dadas por rotación del anillo B de la flavanona.

Tabla 4**.** Energía libre de unión de complejos seleccionados de flavanona-GSK-3β (kcal/mol) calculada con el método MM/PBSA (Kollman et al., 2000; H. Liu & Hou, 2016).

PDB	Ligandos co-cristalizados	Compuesto 1 (8PP)		Compuesto 2 (glabranin)		Compuesto 4 (pinocembrin)	
		Pose a	Pose b	Pose a	Pose b	Pose a	Pose b
1i09	—	-20.1	-21.8	-16.3	-16.0	-16.6	-12.5
1q3w	-23.7	-12.3	-19.1	-23.2	-15.1	-12.9	-17.2
1q41	-22.1	-19.9	-20.4	-15.9	-22.2	-9.8	-10.8
3q3b	-0.6	-21.9	-22.5	-15.3	-11.6	-11.5	-13.6
6ae3	-10.2	-21.3	-13.2	-18.9	-16.4	-6.2	-7.3
Promedio	-14.2	-19.3		-17.1		-11.8	
Mediana	-16.2	-20.3		-16.2		-12.0	

Asimismo, el ensayo de inhibición de la actividad *in vitro* de GSK-3β demuestra que la flavanona 1 es capaz de inhibir la enzima con un IC_{50} de alrededor de 44 µM (figura 46). Esta concentración es más elevada que la concentración capaz de inhibir la fosforilación de tau, así como a la concentración efectiva observada en el ensayo de protección neuronal. En este sentido, la acción sobre GSK-3β posiblemente no sea el único mecanismo que influya sobre la fosforilación de tau en este contexto. Puede proponerse entonces, por ejemplo, la acción sobre otras enzimas quinasa como CDK5 (Carvalho et al., 2017; Santi et al., 2020). Asimismo, estas actividades no serían los únicos procesos que pueden contribuir al efecto neuroprotector. Por ejemplo, debe considerarse también que los flavonoides son compuestos con una importante capacidad de inducir defensas antioxidantes, entre otras actividades (Arredondo et al., 2010; Carvalho et al., 2017; Hole & Williams, 2020; Santi et al., 2020).

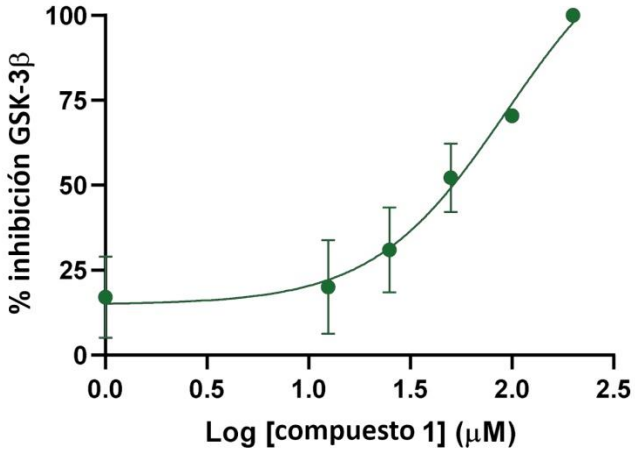


Figura 46. Actividad inhibidora de GSK-3β *in vitro* por el compuesto 1. La actividad inhibidora de GSK-3β se evaluó *in vitro* mediante ensayo luminiscente de GSK-3β humano recombinante (Baki et al., 2007). Los resultados se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples utilizando el programa *GraphPad Prism 6*.

Además de la interacción alostérica con blancos macromoleculares, los flavonoides tienen la capacidad de adquirir formas quinona reactivas y unirse posiblemente de esta manera a grupos tiol (Awad et al., 2002; Martínez-Busi et al., 2019). Se destaca entonces que el sitio activo de la enzima posee una cisteína (Cys 200), por lo que la interacción covalente con este tipo de compuestos es una hipótesis interesante a considerar.

3.3. Reducción de la sobrevida y toxicidad del astrocitos Tg.Old tratados con compuesto 1

La reversión de los fenotipos astrocitarios alterados puede ser otro mecanismo beneficioso en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, se exploró el efecto de la flavanona más potente (flavanona 1) sobre los cultivos astrocitarios Tg.Old. Los resultados mostraron que el tratamiento de los cultivos astrocitarios Tg.Old redujo su viabilidad así como la neurotoxicidad de su medio condicionado. En particular, el tratamiento durante 24 h con la flavanona 1 redujo la viabilidad de los astrocitos Tg.Old con una LC_{50} de alrededor de 4 µM (figura 47). Asimismo, se evidenció que la neurotoxicidad ocasionada por el MCA se reduce en torno a un 19 % tras tratar los cultivos astrocitarios con el compuesto 1 (1 µM) durante 24 h (figura 48).

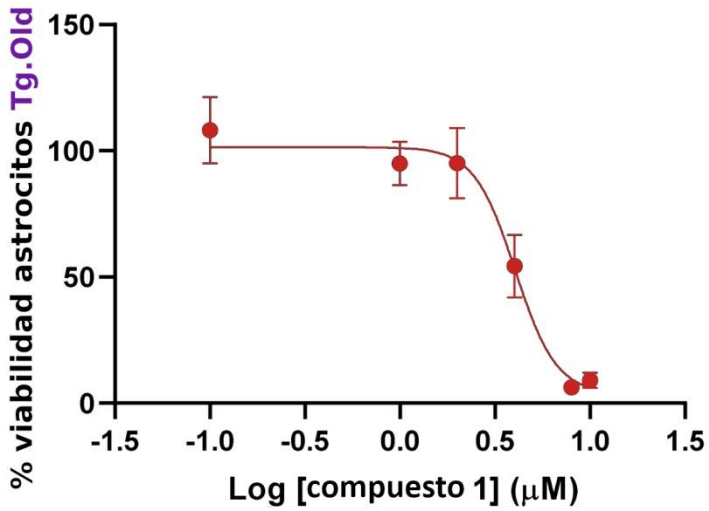


Figura 47. % de viabilidad de astrocitos Tg.Old pretratados durante 24 h con flavanona prenilada 1. La supervivencia de los astrocitos se evaluó mediante el ensayo MTT.

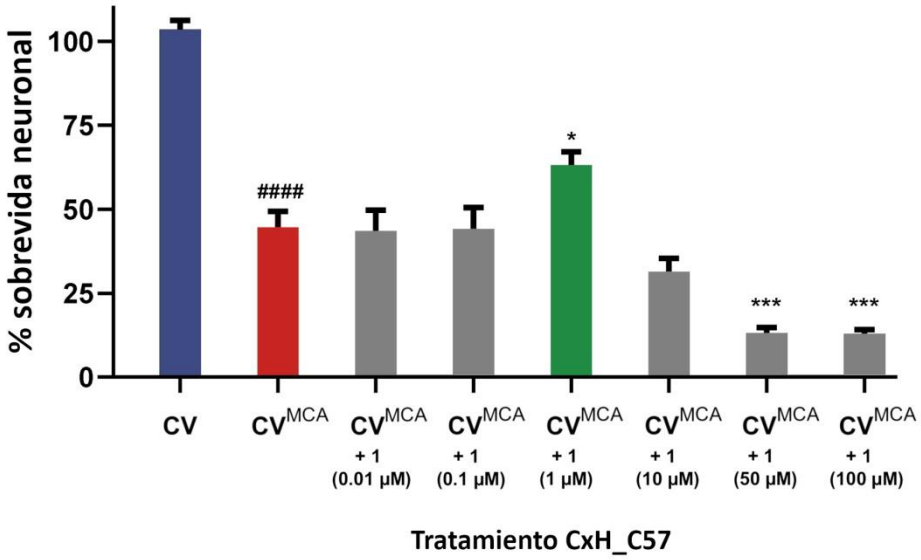


Figura 48. Supervivencia neuronal de neuronas corticales-hipocampales (CxH_C57) tratadas con diferentes MCA. MCA+1: Células CxH_C57 tratadas con MCA de astrocitos Tg.Old pretratados durante 24 h con el compuesto 1 a diferentes concentraciones. # Estadísticamente diferente con respecto al control vehículo (CV). * Estadísticamente diferente respecto al control tras la injuria con MCA de astrocitos Tg.Old sin tratamiento con compuesto 1 (CV^{MCA}). La supervivencia neuronal se evaluó mediante el ensayo MTT. Los resultados se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples utilizando el programa *GraphPad Prism 6*.

Los astrocitos Tg.Old son células proliferantes con un perfil inflamatorio y alteraciones metabólicas semejantes a las células malignas. La evidencias previa sugiere que los flavonoides son inhibidores ubicuos de quinasas, por lo que puede especularse que esta actividad esté asociada a sus efectos sobre los cultivos estudiados (Carvalho et al., 2017; G. L. Russo et al., 2014). Por ejemplo, la inhibición de

varias de estas enzimas sobre células cancerígenas tiene efectos antiproliferantes sobre las mismas (G. L. Russo et al., 2014). Asimismo, un efecto pro-oxidante a través de la formación de formas quinonas de los flavonoides podría explicar los efectos contrapuestos de acuerdo al tipo celular. En el caso de las neuronas, el tratamiento con estos flavonoides puede resultar en la activación de vías intracelulares de respuestas de defensa (por ejemplo, dependiente del factor Nrf2), pero en el caso de los astrocitos Tg.Old, céluas que se encuentran en otro estado bajo condiciones de estrés, el tratamiento con estos compuestos podría superar su capacidad de respuesta protectora, resultando en un efecto citotóxico (Arredondo et al., 2010; Echeverry et al., 2010; Martínez-Busi et al., 2019).

VII. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

1. Aportes del estudio de los astrocitos neurotóxicos 3xTg-AD a la comprensión de la fisiopatología de la EA

A pesar de importantes avances en la investigación de la EA todavía no se tiene una descripción apropiada de su fisiopatología. En este mismo sentido, los tratamientos actuales continúan enfocados en la sintomatología. Alternativamente, las estrategias orientadas a prevenir o revertir el daño se han centrado principalmente en eliminar los agregados amiloideos del SNC, pero hasta el momento no han demostrado ser efectivas (J. L. Cummings et al., 2014; Mahase, 2021b). Frente a esta y otras dificultades, así como a la creciente evidencia de la participación de otros tipos celulares, está emergiendo un nuevo paradigma neuroinflamatorio o celular para el estudio de la EA. El desafío propuesto por varios autores es resolver la compleja interacción celular que subyace a las etapas iniciales de la enfermedad, entendiéndose a esta, por ejemplo, en términos de alteraciones de unidades glía-neurona o neurovasculares y no meramente como una falla bioquímica (De Strooper & Karran, 2016).

Esta tesis presentó resultados derivados de la caracterización transcriptómica y metabolómica de astrocitos derivados de animales adultos sintomáticos del modelo murino 3xTg-AD. Se identifican alteraciones importantes asociadas a rutas proliferativas, proinflamatorias así como alteraciones asociadas al metabolismo energético, la homeostasis de iones y neurotransmisores, entre otras. Se destaca específicamente la regulación al alza de enzimas (cPLA2, Plat) y mediadores pro-inflamatorios (citoquinas, intermediarios de la ruta del ácido araquidónico, etc.) así como factores tróficos (Bdnf, Ngf) con un posible efecto nocivo. De gran importancia son también alteraciones asociadas a la mitocondria, uno de los principales centros energéticos y de señalización celular. Alteraciones de la expresión de metabolitos clave para la función del sistema nervioso, glutamato y GABA, así como de enzimas y transportadores asociados a su homeostasis también fueron evidenciadas.

Este tipo de alteraciones como, por ejemplo, la posible disminución del funcionamiento mitocondrial, podrían explicar mejor el origen de formas esporádicas de la EA, ya sean resultado de una exposición al ambiente o mediante un componente genético (J. Yao et al., 2009). En el mismo sentido, el perfil observado se asemeja al comportamiento de células transformadas y senescentes, lo que apoya la hipótesis de que existen mecanismos comunes al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, trastornos metabólicos y cáncer (Martin-Jiménez et al., 2017; Sánchez-Valle et al., 2017). Se destaca el rol de los factores de transcripción c-Myc, NF-κB y Hif-1α como posibles impulsores del fenotipo neurotóxico (Arias-Cavieres et al., 2020; Goetzman & Prochownik, 2018; Granic et al., 2009; D. M. Miller et al., 2012; T. Zhang et al., 2020).

Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un proceso de senescencia vinculado a la aparición de este tipo de astrocitos, lo que también se ha asociado al desarrollo de la EA en seres humanos (Han et al., 2020). Este estado reactivo-senescente particular sería producido a partir de respuestas de estrés subyacentes, como por ejemplo, una respuesta de proteína desplegada en el retículo endoplasmático. Dichas alteraciones se iniciarían como cambios adaptativos de la función astrocitaria durante la progresión de la patología, pero luego podrían promover de manera sinérgica la muerte neuronal al impactar negativamente sobre las funciones de soporte o mediante una producción excesiva de mediadores proinflamatorios u otros agentes nocivos (figura 49).

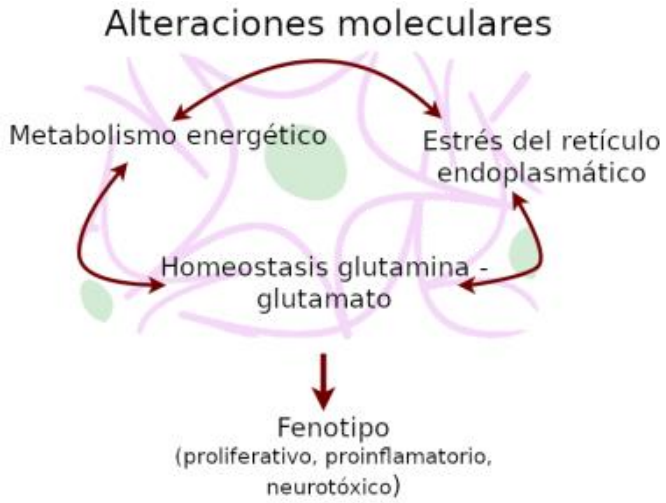


Figura 49. Mecanismo hipotético subyacente al fenotipo de los astrocitos neurotóxicos 3xTg-AD.

2. Oportunidades de investigación y desafíos ante la complejidad de la respuesta astrocitaria en la EA

Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos sugieren alteraciones importantes que deben confirmarse mediante ensayos experimentales más robustos. Conocer con certeza la actividad mitocondrial, por ejemplo, requiere de estudios funcionales específicos tales como ensayos de actividad en equipos *Oroboros* o *Seahorse* y métodos descriptivos más completos. Se tienen, por ejemplo, la electroforesis nativa (*blue native*) que permite evaluar la formación de supercomplejos, así como estudios de microscopía con marcadores específicos (sondas *MitoTracker*^{TM}) que permitan evaluar cambios en la organización mitocondrial. Asimismo, es importante verificar la existencia de estrés de retículo, la expresión de mediadores proinflamatorios y proliferativos, y demás alteraciones metabólicas asociadas, por ejemplo, mediante diversos ensayos de biología molecular, ensayos de actividad enzimática, medidas de alteración de metabolitos clave en estado estacionario y estudios de flujo metabólico, entre otros (Nakayama et al., 2014; Samali et al., 2010; You et al., 2019).

La astrogliosis es un proceso complejo, dependiente del contexto, que resulta en respuestas graduadas y variadas que difícilmente puedan catalogarse como exclusivamente beneficiosas o perjudiciales. Por lo tanto, es de vital importancia estudiar la plasticidad de los astrocitos y su interacción con otros tipos

celulares. Asimismo, existe un conocimiento muy limitado de la función astrocitaria incluyendo su metabolismo (importancia de la función mitocondrial frente al metabolismo glucolítico, grado de acoplamiento con el metabolismo neuronal), mecanismos de respuesta al estrés en astrocitos como estrés del retículo, procesos de senescencia en astrocitos, etc. Por ejemplo, en este último caso, no está esclarecido que mecanismo determina el aumento del perfil inflamatorio en astrocitos con la edad o si los cambios de tipo senescente como en la expresión de citoquinas, alteraciones de la estructura nuclear, y la acumulación de lipofuscina en el citoplasma también están ligados a un aumento de la expresión de p16INK4a y detención del ciclo celular o (Salminen et al., 2011). Estos desafíos requieren el uso de nuevas estrategias de análisis con un menor sesgo, métodos de integración y nuevos modelos así como modelos más realistas.

Futuros estudios histológicos y de caracterización longitudinal serán necesarios para determinar la presencia *in vivo* de astrocitos con un fenotipo similar a los Tg.Old y su efecto en la progresión de la enfermedad. Es de especial interés la posible relación entre procesos de reactividad y senescencia celular. Métodos de caracterización molecular no dirigidos como la secuenciación de ARN de célula única (*single cell RNA-seq*) o la secuenciación de núcleo único, así como la transcriptómica espacial aportan una mayor resolución y reducen la distancia entre acercamientos *in vivo* e *in vitro* (De Strooper & Karran, 2016; Escartin et al., 2021; Hasel et al., 2021; Monterey et al., 2021; Wheeler et al., 2020). Este tipo de métodos permiten evaluar la expresión génica de varios tipos de células simultáneamente, por ejemplo, luego de un mismo estímulo. Además, idealmente, son agnósticos respecto del tipo celular, lo que permitiría el descubrimiento de nuevos fenotipos. La limitante más obvia es que los cambios son observados únicamente a nivel del transcriptoma. Por ello, serán igualmente necesarias aproximaciones más clásicas y reduccionistas para validar hipótesis *in vivo*.

Complementariamente, estudios *in vivo* con nuevos marcadores (astrocitarios, reactividad, senescencia) y radiotrazadores PET (Tomografía por Emisión de Positrones) en modelos animales podrían acelerar la investigación en seres humanos. Las técnicas PET junto a la Imagenología por Resonancia Magnética (MRI) permiten realizar mediciones funcionales y estructurales del cerebro *in vivo* de manera no invasiva con aplicaciones preclínicas como clínicas (Boche et al., 2019; Chiquita et al., 2019; Zimmer et al., 2014). El conjunto de estos acercamientos ayudarían a elucidar en qué momento aparece este tipo de astrocitos; los cambios histológicos, funcionales (ej. captación de glucosa), y cognitivos concomitantes; y la relación de estos con su perfil neurotóxico.

2.1. Caracterización del secretoma astrocitario e identificación del agente neurotóxico

Otro aspecto fundamental de la función astrocitaria es el hecho de que estas células poseen una rica maquinaria de exocitosis involucrada en la secreción de neurotransmisores y sus precursores, hormonas, factores tróficos, etc. que contribuyen a la denominada *red gliocrina* del SNC (Vardjan et al., 2019; Verkhratsky et al., 2016). La aplicación, por ejemplo, de técnicas de proteómica a la identificación y cuantificación sistemática de las proteínas secretadas por la glía en distintos contextos ayudará a la compresión del rol homeostático y patológico de los astrocitos. Con este fin, se están desarrollando

actualmente catálogos en línea para el acceso y comparación de distintos secretomas por parte de la comunidad científica (K. J. Brown et al., 2013; Keene et al., 2009).

La identidad de los agentes neurotóxicos secretados por estas células y su mecanismo de acción, así como otras acciones perjudiciales para el desarrollo y funcionamiento neuronal, no están completamente descriptos (Boisvert et al., 2018; Bouvier et al., 2022; Garber et al., 2018; Guttenplan et al., 2021; Joshi et al., 2019; Liddelow et al., 2017). Tal como señalan otros autores los fenotipos astrocitarios neurotóxicos podrían haber evolucionado como parte de un mecanismo para mitigar infecciones (Liddelow & Barres, 2017) o como parte de procesos de plasticidad del sistema nervioso. Algunas características de los llamados astrocitos A1 apoyan esta hipótesis. Estos secretan varios componentes de la cascada del complemento que podrían mejorar la remoción de bacterias por el sistema inmune, interrumpir una infección viral o remover neuronas infectadas (Liddelow et al., 2017). Otras evidencias in vitro sugieren la liberación al medio de fragmentos mitocondriales o lípidos con actividad citotóxica (Guttenplan et al., 2021; Joshi et al., 2019). El estudio de las alteraciones lipídicas en la EA es un área importante de investigación destacándose alteraciones asociadas al metabolismo de los esfingolípidos (Giovagnoni et al., 2021). Asimismo, se han descripto algunas proteínas con efecto pro-apoptótico, como por ejemplo Lcn2 (Bi et al., 2013). Uno de los indicios más interesantes presentados en esta tesis es la regulación al alza de factores de crecimiento con efecto dual tal como Bdnf. La señalización por Bdnf a través del receptor TrkB se ha asociado a efectos tanto pro como anti-inflamatorios regulando las ruta p38/JNK, SP/NK1R y NR1 (*NMDA receptor 1*) (M. Liu et al., 2015; Malcangio & Lessmann, 2003). Procedimientos de fraccionamiento en medios de cultivo condicionado, acoplados a a ensayos de proteómica y estudios de metabolómica dirigida, pueden orientar la identificación de los posibles agente neurotóxicos secretados por los astrocitos Tg.Old. Las características de la muestra, sensibilidad de cada técnica u otros factores agregan algunas dificultades. Asimismo, el rol de otras alteraciones astrocitarias que repercutan en la pérdida de soporte neuronal (ej. reducida expresión de GLT-1 o perdida de señalización por TGF-B) también deben considerarse (Garber et al., 2018; Liddelow & Sofroniew, 2019; Rothstein et al., 1995; Tong et al., 2013).

2.2. Desarrollo de nuevos modelos *in vitro* de astrocitos; reevaluación y o desarrollo de nuevos modelos de la EA

Como se mencionó anteriormente se requieren modelos más realistas de astrocitos para el estudio de sus funciones homeostáticas, respuestas frente al daño y procesos de senescencia, entre otros. Para ello se proponen nuevas tecnologías como el desarrollo de cultivos de astrocitos derivados de células madre pluripotentes humanas (hiPSCs, *human induced pluripotent stem cells*), nuevos protocolos de aislamiento y purificación, cultivos tridimensionales (3D) (Marton et al., 2019; Sloan et al., 2017) y sistemas de organoides cerebrales que logren representar mejor las características *in vivo* de estas células (Sidhaye & Knoblich, 2020; Yoon et al., 2019). Asimismo, el desarrollo de nuevos modelos que reflejen mejor las características de la EA es un área importante de interés (Cetin et al., 2022; Oblak et al., 2020; Sasaguri et al., 2022). Se tiene por ejemplo el consorcio MODEL-AD (*https://www.model-ad.org/*) que busca generar modelos de ratón que incorporen variantes genéticas de riesgo humanizadas (Baglietto-Vargas et al., 2021; Oblak et al., 2020, 2021). Este proyecto también realiza una recaracterización de modelos conocidos utilizando técnicas del estado del arte permitiendo la comparación entre modelos y su uso

adecuado a la interrogante que se desee evaluar. En menor medida, otros grupos están considerando modelos no-transgénicos de la EA como el de tratamiento con estreptozocina que permitan estudiar la influencia de otros factores como infecciones o diabetes tipo 2 (Flores-Cuadra et al., 2021; Movassat et al., 2019; Seaks & Wilcock, 2020; Takeda et al., 2010).

2.3. Integración de modelos y estrategias de análisis

A efectos de obtener una imagen más global de los procesos biológicos también deben desarrollarse estrategias de integración de las distintas fuentes de datos (X. Dai & Shen, 2022; Manzoni et al., 2018; Vahabi & Michailidis, 2022). Estas fuentes pueden incluir abordajes ómicos (transcriptóma, metabolómica, perfiles de metilación de epigenómica, etc.) así como metadatos (resultados de ensayos clínicos, perfiles histológicos, estudios de imagenología). Al respecto, el número de recursos dedicados a la documentación y análisis de varias ómicas en paralelo continúa creciendo. Algunos ejemplos incluyen: *BioSample* (Gostev et al., 2012), *GeneAnalytics* (por suscripción) (Fuchs et al., 2016), *BioWardrobe* (Kartashov & Barski, 2015), *European Open Science Cloud* ("European Open Science Cloud," 2016). Sin embargo, existen varias dificultades técnicas y biológicas para integrar este tipo de datos incluyendo diferencias en el origen y procedimiento de análisis, nomenclatura inconsistente entre las distintas fuentes (para genes, proteínas, etc.), limitaciones en los recursos computacionales, escasez de anotaciones y por sobre todo un conocimiento limitado de la estructura de las vías de señalización intracelulares, especialmente su rearreglo en cada linaje celular. A todo lo anterior se agregan limitaciones de las técnicas experimentales, considerando la metabolómica por ejemplo: pobre cobertura del metaboloma, sesgos en la cuantificación, dificultades en la anotación de metabolitos, etc. Resolver estas dificultades requerirá un extenso trabajo de investigación básica, curado de repositorios y posiblemente implementación de estrategias a *primeros principios* para la anotación de genes y rutas de rutas de señalización (*ab intitio* o *data-driven*) (Froehlich et al., 2007).

2.4. Los astrocitos como potencial blanco terapéutico

Dada su complejidad, la participación de múltiples eventos patogénicos y, sobre todo, el hecho de que en el momento de ser diagnosticada ya se ha perdido un número importante de neuronas, es difícil que la EA se alivie con un único tratamiento. Por el contrario, varias estrategias deben considerarse incluyendo cambios en el estilo de vida y posiblemente múltiples tratamientos farmacológicos o fármacos multi-diana que intervengan en etapas tempranas, es decir, antes de que la inercia del proceso genere un daño irreparable (Millan, 2006; Zimmermann et al., 2007). Por estos motivos también existen un creciente interés en desarrollar terapias que restauren el tejido neuronal (Felsenstein et al., 2014).

En este contexto, la evidencia acumulada así como los resultados presentados en esta tesis apoyan la idea de que los astrocitos son un potencial blanco de nuevos tratamientos. Estos tratamientos podrían, por ejemplo, regular el perfil pro- o antiinflamatorio de los astrocitos, así como potenciar su capacidad reparadora. Dicha estrategia remarca varias dificultades incluyendo la necesidad de modular múltiples dianas moleculares; presencia de estas dianas en otros linajes celulares como microglia y neuronas; presencia de efectos mixtos de los fármacos; heterogeneidad de los astrocitos según región, etapa de la enfermedad, etc. así como diferencias entre astrocitos murinos y humanos (Hyvärinen et al., 2019; Klegeris, 2021; Lun Li et al., 2021; Y. Zhang et al., 2016). Por otro lado, la posible participación de

procesos de senescencia astrocitaria en la EA, es también un arma de doble filo. La experiencia en otras patologías como el cáncer muestra que modular este fenotipo, inducir estados de senescencia o limitarlos, puede resultar tanto en efectos beneficiosos como perjudiciales (Soyoung Lee & Schmitt, 2019).

De acuerdo a los resultados presentados en esta tesis pueden sugerirse varios blancos de intervención. Por ejemplo, revertir posibles respuestas de estrés en el ER y restaurar la función mitocondrial en los astrocitos puede tener varios efectos beneficiosos considerando su asociación con el metabolismo, estrés oxidativo e inflamación que subyacen diversas patologías (Bantle et al., 2021; Hotamisligil, 2010; Martin-Jiménez et al., 2017; Sprenkle et al., 2017; Tsachaki et al., 2018; Yadav et al., 2014). Recurrir a inhibidores de IRE-1 es una estrategia considerada en otros contextos patológicos (R. Ghosh et al., 2014; Sheng et al., 2019). Sin embargo muchas de estas asociaciones son indirectas y los detalles mecanísticos son todavía opacos por lo que se también se requiera más investigación básica sobre el funcionamiento de estos organelos en los astrocitos y su alteración en procesos patológicos.

Los astrocitos 3xTg-AD viejos presentan varios rasgos similares a las células malignas incluyendo un aumento de la capacidad proliferativa y posiblemente una regulación al alza de la ruta de las pentosas fosfato. Esta ruta ayudaría a las células malignas a protegerse del estrés oxidativo incrementando su poder reductor mediante la producción de NADPH. En ese contexto se han propuesto inhibidores de la enzima de paso limitante, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, de manera de desestimular el crecimiento celular (Kowalik et al., 2017; Tsachaki et al., 2018).

Considerando la complejidad de los procesos de neurodegeneración y las experiencias negativas en el desarrollo de nuevas terapias para estas patologías, cualquier traslación de los resultados de un modelo preclínico debe realizarse con extrema precaución. El reposicionamiento de drogas probablemente sea la estrategia más adecuada para resolver las dificultades planteadas (Fang et al., 2022; Hole & Williams, 2020; Kumar et al., 2021; Santi et al., 2020; M. Zhang et al., 2016). Existen varias moléculas prometedoras como fingolimod (inhibidor del metabolismo de los esfingolípidos), tratamientos anti-cancerígenos, activadores PPAR, etc. (Ancidoni et al., 2021; Fagan et al., 2022; Sagheddu et al., 2021). El uso de productos naturales como los flavonoides, que poseen un perfil de seguridad probado y actividad multi-diana es otra estrategia de interés. Estos compuestos poseen múltiples actividades beneficiosas —anti-inflamatorias, anti-oxidantes— y su potencial está actualmente siendo evaluado en modelos *in vitro* e *in vivo* de EA (Hole & Williams, 2020; Santi et al., 2020).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Åberg, K. M., Torgrip, R. J. O., Kolmert, J., Schuppe-Koistinen, I., & Lindberg, J. (2008). Feature detection and alignment of hyphenated chromatographic–mass spectrometric data: Extraction of pure ion chromatograms using Kalman tracking. *Journal of Chromatography A*, *1192*(1), 139–146. https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2008.03.033

Abramov, A. Y., Canevari, L., & Duchen, M. R. (2003). Changes in Intracellular Calcium and Glutathione in Astrocytes as the Primary Mechanism of Amyloid Neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, *23*(12), 5088–5095. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-12-05088.2003

Abramov, A. Y., Canevari, L., & Duchen, M. R. (2004). β-Amyloid Peptides Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Astrocytes and Death of Neurons through Activation of NADPH Oxidase. *Journal of Neuroscience*, *24*(2), 565–575. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4042-03.2004

Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, *32*(4), 529–539. https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2008.10.021/ATTACHMENT/13D1B469-5322-49D0-94B0-E4DA66EFAACD/MMC1.PDF

Acioglu, C., Li, L., & Elkabes, S. (2021). Contribution of astrocytes to neuropathology of neurodegenerative diseases. *Brain Research*, *1758*, 147291. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2021.147291

Ackermann, M., & Strimmer, K. (2009). A general modular framework for gene set enrichment analysis. *BMC Bioinformatics*, *10*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-47/TABLES/8

Acklin, S., Zhang, M., Du, W., Zhao, X., Plotkin, M., Chang, J., Campisi, J., Zhou, D., & Xia, F. (2020). Depletion of senescent-like neuronal cells alleviates cisplatin-induced peripheral neuropathy in mice. *Scientific Reports 2020 10:1*, *10*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-020-71042-6

Adhami, F., Yu, D., Yin, W., Schloemer, A., Burns, K. A., Liao, G., Degen, J. L., Chen, J., & Kuan, C.-Y. (2008). Deleterious Effects of Plasminogen Activators in Neonatal Cerebral Hypoxia-Ischemia. *The American Journal of Pathology*, *172*(6), 1704–1716. https://doi.org/10.2353/AJPATH.2008.070979

Aisen, P. S., Schafer, K. A., Grundman, M., Pfeiffer, E., Sano, M., Davis, K. L., Farlow, M. R., Jin, S., Thomas, R. G., & Thal, L. J. (2003). Effects of Rofecoxib or Naproxen vs Placebo on Alzheimer Disease Progression: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, *289*(21), 2819–2826. https://doi.org/10.1001/JAMA.289.21.2819

Alam, J., Blackburn, K., & Patrick, D. (2017). Neflamapimod: Clinical Phase 2b-Ready Oral Small Molecule Inhibitor of p38α to Reverse Synaptic Dysfunction in Early Alzheimer's Disease. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, *4*(4), 273–278. https://doi.org/10.14283/JPAD.2017.41

Alam, J. J. (2015). Selective Brain-Targeted Antagonism of p38 MAPKα Reduces Hippocampal IL-1β Levels and Improves Morris Water Maze Performance in Aged Rats. *Journal of Alzheimer's Disease*, *48*(1), 219–227. https://doi.org/10.3233/JAD-150277

Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M. V., Cavaliere, F., Pérez-Samartín, A., Zugaza, J. L., Trullas, R., Domercq, M., & Matute, C. (2010). Amyloid β oligomers induce Ca2+ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium*, *47*(3), 264–272. https://doi.org/10.1016/J.CECA.2009.12.010

Alberdi, E., Wyssenbach, A., Alberdi, M., Sánchez-Gómez, M. V., Cavaliere, F., Rodríguez, J. J., Verkhratsky, A., & Matute, C. (2013). Ca2+-dependent endoplasmic reticulum stress correlates with astrogliosis in oligomeric amyloid β-treated astrocytes and in a model of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, *12*(2), 292–302. https://doi.org/10.1111/ACEL.12054

Aldabbagh, Y., Islam, A., Zhang, W., Whiting, P., & Ali, A. (2021). Reactive astrocytes augment hippocampal inhibitory tone via GABA transporter-3/4 to facilitate synaptic balance in Alzheimer's disease. *Authorea Preprints*. https://doi.org/10.22541/AU.162617031.19812509/V1

Aldabbagh, Y., Islam, A., Zhang, W., Whiting, P., & Ali, A. B. (2022). Alzheimer's Disease Enhanced Tonic Inhibition is Correlated With Upregulated Astrocyte GABA Transporter-3/4 in a Knock-In APP Mouse Model. *Frontiers in*

Pharmacology, *13*, 146. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.822499/BIBTEX

Allaman, I., Gavillet, M., Bélanger, M., Laroche, T., Viertl, D., Lashuel, H. A., & Magistretti, P. J. (2010). Amyloid-β Aggregates Cause Alterations of Astrocytic Metabolic Phenotype: Impact on Neuronal Viability. *Journal of Neuroscience*, *30*(9), 3326–3338. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5098-09.2010

Almad, A. A., Taga, A., Joseph, J., Gross, S. K., Welsh, C., Patankar, A., Richard, J. P., Rust, K., Pokharel, A., Plott, C., Lillo, M., Dastgheyb, R., Eggan, K., Haughey, N., Contreras, J. E., & Maragakis, N. J. (2022). Cx43 hemichannels contribute to astrocyte-mediated toxicity in sporadic and familial ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(13), e2107391119. https://doi.org/10.1073/PNAS.2107391119/SUPPL_FILE/PNAS.2107391119.SAPP.PDF

Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultsinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., de Belleroche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., … Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal*, *286*(2), 241–278. https://doi.org/10.1111/FEBS.14608

Alonso, A., Julià, A., Beltran, A., Vinaixa, M., Díaz, M., Ibañez, L., Correig, X., & Marsal, S. (2011). AStream: an R package for annotating LC/MS metabolomic data. *Bioinformatics*, *27*(9), 1339–1340. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR138

Álvarez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., & Castro, M. D. L. de. (2010). Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *29*(2), 120–127. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2009.12.004

Álvarez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2010). Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *29*(2), 111–119. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2009.12.003

Alzheimer's Association. (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, *15*(3), 321–387. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010

Alzheimer's Disease International. (2020). 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, *16*(3), 391–460. https://doi.org/10.1002/alz.12068

Alzheimer's Disease International. (2022). 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, *18*(4), 700–789. https://doi.org/10.1002/alz.12638

Amtul, Z., Uhrig, M., Wang, L., Rozmahel, R. F., & Beyreuther, K. (2012). Detrimental effects of arachidonic acid and its metabolites in cellular and mouse models of Alzheimer's disease: structural insight. *Neurobiology of Aging*, *33*(4), 831.e21-831.e31. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2011.07.014

Ancidoni, A., Bacigalupo, I., Remoli, G., Lacorte, E., Piscopo, P., Sarti, G., Corbo, M., Vanacore, N., & Canevelli, M. (2021). Anticancer drugs repurposed for Alzheimer's disease: a systematic review. *Alzheimer's Research and Therapy*, *13*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/S13195-021-00831-6/FIGURES/3

Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, *11*(10), 1–12. https://doi.org/10.1186/GB-2010-11-10-R106/COMMENTS

Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166–169. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU638

Andersen, J. V., Markussen, K. H., Jakobsen, E., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., Rosenberg, P. A., & Aldana, B. I. (2021). Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, *196*, 108719. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2021.108719

Anderson, M. A., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience Letters*, *565*, 23–29. https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2013.12.030

Anderson, M. A., Burda, J. E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B. S., Deming, T. J., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature 2016 532:7598*, *532*(7598), 195–200. https://doi.org/10.1038/nature17623

Anderson, P. E., Reo, N. V., DelRaso, N. J., Doom, T. E., & Raymer, M. L. (2008). Gaussian binning: a new kernel-based method for processing NMR spectroscopic data for metabolomics. *Metabolomics 2008 4:3*, *4*(3), 261–272. https://doi.org/10.1007/S11306-008-0117-3

Andrews, S. (2010). *FastQC:A quality control tool for high throughput sequence data*. Babraham Bioinformatics. http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Angeli, S., Kousiappa, I., Stavrou, M., Sargiannidou, I., Georgiou, E., Papacostas, S. S., & Kleopa, K. A. (2020). Altered Expression of Glial Gap Junction Proteins Cx43, Cx30, and Cx47 in the 5XFAD Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, *14*, 1060. https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.582934/BIBTEX

Angelucci, F., Cechova, K., Amlerova, J., & Hort, J. (2019). Antibiotics, gut microbiota, and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation 2019 16:1*, *16*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/S12974-019-1494-4

Apelt, J., Ach, K., & Schliebs, R. (2003). Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative β-amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of β-amyloid plaques. *Neuroscience Letters*, *339*(3), 183–186. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00030-2

Arbe, M. F., Agnetti, L., Breininger, E., Glikin, G. C., Finocchiaro, L. M. E., & Villaverde, M. S. (2020). Glucose 6-phosphate dehydrogenase inhibition sensitizes melanoma cells to metformin treatment. *Translational Oncology*, *13*(11), 100842. https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2020.100842

Arendash, G. W., Mori, T., Cao, C., Mamcarz, M., Runfeldt, M., Dickson, A., Rezai-Zadeh, K., Tan, J., Citron, B. A., Lin, X., Echeverria, V., & Potter, H. (2009). Caffeine Reverses Cognitive Impairment and Decreases Brain Amyloid-β Levels in Aged Alzheimer's Disease Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, *17*(3), 661–680. https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1087

Arias-Cavieres, A., Khuu, M. A., Nwakudu, C. U., Barnard, J. E., Dalgin, G., & Garcia, A. J. (2020). A HIF1a-Dependent Pro-Oxidant State Disrupts Synaptic Plasticity and Impairs Spatial Memory in Response to Intermittent Hypoxia. *ENeuro*, *7*(3), 1–12. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0024-20.2020

Ariga, H. (2015). Common Mechanisms of Onset of Cancer and Neurodegenerative Diseases. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *38*(6), 795–808. https://doi.org/10.1248/BPB.B15-00125

Armitage, E. G., Godzien, J., Alonso-Herranz, V., López-Gonzálvez, Á., & Barbas, C. (2015). Missing value imputation strategies for metabolomics data. *ELECTROPHORESIS*, *36*(24), 3050–3060. https://doi.org/10.1002/ELPS.201500352

Arredondo, F., Echeverry, C., Abin-Carriquiry, J. a, Blasina, F., Antúnez, K., Jones, D. P., Go, Y.-M., Liang, Y.-L., & Dajas, F. (2010). After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radical Biology & Medicine*, *49*(5), 738–747. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.020

Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics 2000 25:1*, *25*(1), 25–29. https://doi.org/10.1038/75556

Assefa, B. T., Gebre, A. K., & Altaye, B. M. (2018). Reactive Astrocytes as Drug Target in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/4160247

Astakhova, A., Chistyakov, D., Thomas, D., Geisslinger, G., Brüne, B., Sergeeva, M., & Namgaladze, D. (2019). Inhibitors of Oxidative Phosphorylation Modulate Astrocyte Inflammatory Responses through AMPK-Dependent Ptgs2 mRNA Stabilization. *Cells 2019, Vol. 8, Page 1185*, *8*(10), 1185. https://doi.org/10.3390/CELLS8101185

Athauda, D., & Foltynie, T. (2016). The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action. *Drug Discovery Today*, *21*(5), 802–818. https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2016.01.013

Atwood, C. S., & Bowen, R. L. (2015). A Unified Hypothesis of Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Journal of Alzheimer's Disease*, *47*(1), 33–47. https://doi.org/10.3233/JAD-143210

Auer, P. L., & Doerge, R. W. (2010). Statistical Design and Analysis of RNA Sequencing Data. *Genetics*, *185*(2), 405–416. https://doi.org/10.1534/GENETICS.110.114983

Awad, H. M., Boersma, M. G., Boeren, S., van Bladeren, P. J., Vervoort, J., & Rietjens, I. M. C. M. (2002). The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent. *Chemical Research in Toxicology*, *15*(3), 343–351. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11896681

Awasthi, M., Singh, S., Pandey, V. P., & Dwivedi, U. N. (2016). Alzheimer's disease: An overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with in silico approaches emphasizing the role of natural products. *Journal of the Neurological Sciences*, *361*, 256–271. https://doi.org/10.1016/J.JNS.2016.01.008

Babenko, V. N., Smagin, D. A., Galyamina, A. G., Kovalenko, I. L., & Kudryavtseva, N. N. (2018). Altered Slc25 family gene expression as markers of mitochondrial dysfunction in brain regions under experimental mixed anxiety/depression-like disorder. *BMC Neuroscience*, *19*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/S12868-018-0480-6/TABLES/1

Baglietto-Vargas, D., Forner, S., Cai, L., Martini, A. C., Trujillo-Estrada, L., Swarup, V., Nguyen, M. M. T., Do Huynh, K., Javonillo, D. I., Tran, K. M., Phan, J., Jiang, S., Kramár, E. A., Nuñez-Diaz, C., Balderrama-Gutierrez, G., Garcia, F., Childs, J., Rodriguez-Ortiz, C. J., Garcia-Leon, J. A., … LaFerla, F. M. (2021). Generation of a humanized Aβ expressing mouse demonstrating aspects of Alzheimer's disease-like pathology. *Nature Communications*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/S41467-021-22624-Z

Bairoch, A., Boeckmann, B., Ferro, S., & Gasteiger, E. (2004). Swiss-Prot: Juggling between evolution and stability. *Briefings in Bioinformatics*, *5*(1), 39–55. https://doi.org/10.1093/BIB/5.1.39

Baker, D. J., & Petersen, R. C. (2018). Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(4), 1208–1216. https://doi.org/10.1172/JCI95145

Baki, A., Bielik, A., Molnár, L., Szendrei, G., & Keserü, G. M. (2007). A high throughput luminescent assay for glycogen synthase kinase-3β inhibitors. *Assay and Drug Development Technologies*, *5*(1), 75–83. https://doi.org/10.1089/adt.2006.029

Baldwin, K. T., & Eroglu, C. (2017). Molecular Mechanisms of Astrocyte-Induced Synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, *45*, 113. https://doi.org/10.1016/J.CONB.2017.05.006

Balsa, E., Soustek, M. S., Thomas, A., Cogliati, S., García-Poyatos, C., Martín-García, E., Jedrychowski, M., Gygi, S. P., Enriquez, J. A., & Puigserver, P. (2019). ER and Nutrient Stress Promote Assembly of Respiratory Chain Supercomplexes through the PERK-eIF2α Axis. *Molecular Cell*, *74*(5), 877-890.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.031

Balu, D. T., Pantazopoulos, H., Huang, C. C. Y., Muszynski, K., Harvey, T. L., Uno, Y., Rorabaugh, J. M., Galloway, C. R., Botz-Zapp, C., Berretta, S., Weinshenker, D., & Coyle, J. T. (2019). Neurotoxic astrocytes express the D-serine synthesizing enzyme, serine racemase, in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *130*, 104511. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2019.104511

Bandea, C. I. (2013). Aβ, tau, α-synuclein, huntingtin, TDP-43, PrP and AA are members of the innate immune system: a unifying hypothesis on the etiology of AD, PD, HD, ALS, CJD and RSA as innate immunity disorders. *BioRxiv*, 000604. https://doi.org/10.1101/000604

Bantle, C. M., Hirst, W. D., Weihofen, A., & Shlevkov, E. (2021). Mitochondrial Dysfunction in Astrocytes: A Role in Parkinson's Disease? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 1587. https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.608026/BIBTEX

Baptista, F. I., Henriques, A. G., Silva, A. M. S., Wiltfang, J., & Da Cruz E Silva, O. A. B. (2014). Flavonoids as therapeutic compounds targeting key proteins involved in Alzheimer's disease. *ACS Chemical Neuroscience*, *5*(2), 83–92. https://doi.org/10.1021/CN400213R/ASSET/IMAGES/CN400213R.SOCIAL.JPEG_V03

Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., … Yednock, T. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid β-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Medicine 2000 6:8*, *6*(8), 916–919. https://doi.org/10.1038/78682

Barker, M., & Rayens, W. (2003). Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, *17*(3), 166–173. https://doi.org/10.1002/CEM.785

Basisty, N., Kale, A., Jeon, O. H., Kuehnemann, C., Payne, T., Rao, C., Holtz, A., Shah, S., Sharma, V., Ferrucci, L., Campisi, J., & Schilling, B. (2020). *A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development*. *18*(1), e3000599. https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.3000599

Basisty, N., Kale, A., Patel, S., Campisi, J., & Schilling, B. (2020). The power of proteomics to monitor senescence-associated secretory phenotypes and beyond: toward clinical applications. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 17, Issue 4, pp. 297–308). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1766976

Bayer, A. J., Bullock, R., Jones, R. W., Wilkinson, D., Paterson, K. R., Jenkins, L., Millais, S. B., & Donoghue, S. (2005). Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic Aβ42 (AN1792) in patients with AD. *Neurology*, *64*(1), 94–101. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000148604.77591.67

Beattie, M. S., Harrington, A. W., Lee, R., Kim, J. Y., Boyce, S. L., Longo, F. M., Bresnahan, J. C., Hempstead, B. L., & Yoon, S. O. (2002). ProNGF Induces p75-Mediated Death of Oligodendrocytes following Spinal Cord Injury. *Neuron*, *36*(3), 375–386. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01005-X

Beauquis, J., Pavía, P., Pomilio, C., Vinuesa, A., Podlutskaya, N., Galvan, V., & Saravia, F. (2013). Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, *239*(1), 28–37. https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2012.09.009

Behl, T., Kaur, D., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Zengin, G., Andronie-Cioara, F. L., Toma, M. M., Bungau, S., & Bumbu, A. G. (2021). Role of Monoamine Oxidase Activity in Alzheimer's Disease: An Insight into the Therapeutic Potential of Inhibitors. *Molecules 2021, Vol. 26, Page 3724*, *26*(12), 3724. https://doi.org/10.3390/MOLECULES26123724

Bélanger, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2011). Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metabolism*, *14*(6), 724–738. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2011.08.016

Belarbi, K., Jopson, T., Tweedie, D., Arellano, C., Luo, W., Greig, N. H., & Rosi, S. (2012). TNF-α protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-23/FIGURES/6_518

Bellozi, P. M. Q., Gomes, G. F., De Oliveira, L. R., Olmo, I. G., Vieira, É. L. M., Ribeiro, F. M., Fiebich, B. L., & De Oliveira, A. C. P. (2019). NVP-BEZ235 (dactolisib) has protective effects in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 1345. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.01345/BIBTEX

Bellozi, P. M. Q., Lima, I. V. de A., Dória, J. G., Vieira, É. L. M., Campos, A. C., Candelario-Jalil, E., Reis, H. J., Teixeira, A. L., Ribeiro, F. M., & de Oliveira, A. C. P. (2016). Neuroprotective effects of the anticancer drug NVP-BEZ235 (dactolisib) on amyloid-β 1–42 induced neurotoxicity and memory impairment. *Scientific Reports 2016 6:1*, *6*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/srep25226

Belov Kirdajova, D., Kriska, J., Tureckova, J., & Anderova, M. (2020). Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 51. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.00051/BIBTEX

Bennett, D. A., Schneider, J. A., Arvanitakis, Z., Kelly, J. F., Aggarwal, N. T., Shah, R. C., & Wilson, R. S. (2006). Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology*, *66*(12), 1837–1844. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000219668.47116.E6

Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horré, K., Wiltfang, J., Esselmann, H., & De Strooper, B. (2006). Presenilin clinical mutations can affect γ-secretase activity by different mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, *96*(3), 732–742. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2005.03578.X

Berent, S., Giordani, B., Foster, N., Minoshima, S., Lajiness-O'Neill, R., Koeppe, R., & Kuhl, D. E. (1999). Neuropsychological function and cerebral glucose utilization in isolated memory impairment and Alzheimers disease. *Journal of Psychiatric Research*, *33*(1), 7–16. https://doi.org/10.1016/S0022-3956(98)90048-6

Berndtsson, J., Aufschnaiter, A., Rathore, S., Marin-Buera, L., Dawitz, H., Diessl, J., Kohler, V., Barrientos, A., Büttner, S., Fontanesi, F., & Ott, M. (2020). Respiratory supercomplexes enhance electron transport by decreasing cytochrome c diffusion distance. *EMBO Reports*, *21*(12). https://doi.org/10.15252/EMBR.202051015

Bettens, K., Sleegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2013). Genetic insights in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, *12*(1), 92–104. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70259-4

Beurel, E., & Jope, R. S. (2006). The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Progress in Neurobiology*, *79*(4), 173–189. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2006.07.006

Beydoun, M. A., Beydoun, H. A., & Wang, Y. (2008). Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews : An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *9*(3), 204–218. https://doi.org/10.1111/J.1467-789X.2008.00473.X

Bharath, L. P., Agrawal, M., McCambridge, G., Nicholas, D. A., Hasturk, H., Liu, J., Jiang, K., Liu, R., Guo, Z., Deeney, J., Apovian, C. M., Snyder-Cappione, J., Hawk, G. S., Fleeman, R. M., Pihl, R. M. F., Thompson, K., Belkina, A. C., Cui, L., Proctor, E. A., … Nikolajczyk, B. S. (2020). Metformin Enhances Autophagy and Normalizes Mitochondrial Function to Alleviate Aging-Associated Inflammation. *Cell Metabolism*, *32*(1), 44-55.e6. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2020.04.015/ATTACHMENT/0F49D309-6BA4-4900-9292-6822E8021FB2/MMC1.PDF

Bhat, R., Crowe, E. P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C. D., Garcia, F. U., Johnson, F. B., Trojanowski, J. Q., Sell, C., & Torres, C. (2012). Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, *7*(9), e45069. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045069

Bhattarai, K. R., Riaz, T. A., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2021). The aftermath of the interplay between the endoplasmic reticulum stress response and redox signaling. *Experimental & Molecular Medicine 2021 53:2*, *53*(2), 151–167. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00560-8

Bi, F., Huang, C., Tong, J., Qiu, G., Huang, B., Wu, Q., Li, F., Xu, Z., Bowser, R., Xia, X. G., & Zhou, H. (2013). Reactive astrocytes secrete lcn2 to promote neuron death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(10), 4069–4074. https://doi.org/10.1073/pnas.1218497110

Bieschke, J., Russ, J., Friedrich, R. P., Ehrnhoefer, D. E., Wobst, H., Neugebauer, K., & Wanker, E. E. (2010). EGCG remodels mature α-synuclein and amyloid-β fibrils and reduces cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(17), 7710–7715. https://doi.org/10.1073/PNAS.0910723107/SUPPL_FILE/PNAS.0910723107_SI.PDF

Bigl, M., Brückner, M. K., Arendt, T., Bigl, V., & Eschrich, K. (1999). Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission 1999 106:5*, *106*(5), 499–511. https://doi.org/10.1007/S007020050174

Bijlsma, S., Bobeldijk, I., Verheij, E. R., Ramaker, R., Kochhar, S., Macdonald, I. A., Van Ommen, B., & Smilde, A. K. (2005). Large-Scale Human Metabolomics Studies: A Strategy for Data (Pre-) Processing and Validation. *Analytical Chemistry*, *78*(2), 567–574. https://doi.org/10.1021/AC051495J

Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal Aβ causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, *45*(5), 675–688. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.040

Birch, J., & Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes & Development*, *34*(23–24), 1565–1576. https://doi.org/10.1101/GAD.343129.120

Bittner, T., Fuhrmann, M., Burgold, S., Ochs, S. M., Hoffmann, N., Mitteregger, G., Kretzschmar, H., Laferla, F. M., & Herms, J. (2010). Multiple Events Lead to Dendritic Spine Loss in Triple Transgenic Alzheimer's Disease Mice. *PLOS ONE*, *5*(11), e15477. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0015477

Bitto, A., Sell, C., Crowe, E., Lorenzini, A., Malaguti, M., Hrelia, S., & Torres, C. (2010). Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes. *Experimental Cell Research*, *316*(17), 2961–2968. https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2010.06.021

Blasko, I., Veerhuis, R., Stampfer-Kountchev, M., Saurwein-Teissl, M., Eikelenboom, P., & Grubeck-Loebenstein, B. (2000). Costimulatory Effects of Interferon-γ and Interleukin-1β or Tumor Necrosis Factor α on the Synthesis of Aβ1-40 and Aβ1-42 by Human Astrocytes. *Neurobiology of Disease*, *7*(6), 682–689. https://doi.org/10.1006/NBDI.2000.0321

Blass, J. P., Sheu, R. K. F., & Gibson, G. E. (2000). Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interaction with cerebrovascular compromise. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *903*, 204–221. https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2000.TB06370.X

Blondel, V. D., Guillaume, J. L., Lambiotte, R., & Lefebvre, E. (2008). Fast unfolding of communities in large networks. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, *2008*(10), P10008. https://doi.org/10.1088/1742-5468/2008/10/P10008

Boccard, J., Veuthey, J. L., & Rudaz, S. (2010). Knowledge discovery in metabolomics: An overview of MS data handling. *Journal of Separation Science*, *33*(3), 290–304. https://doi.org/10.1002/JSSC.200900609

Boche, D., Gerhard, A., & Rodriguez-Vieitez, E. (2019). Prospects and challenges of imaging neuroinflammation beyond TSPO in Alzheimer's disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *46*(13), 2831–2847. https://doi.org/10.1007/s00259-019-04462-w

Boisvert, M. M., Erikson, G. A., Shokhirev, M. N., & Allen, N. J. (2018). The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain. *Cell Reports*, *22*(1), 269–285. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29298427/

Bolaños, J. P. (2016). Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 115–125. https://doi.org/10.1111/JNC.13486

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170

Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Åstrand, M., & Speed, T. P. (2003). A comparison of normalization methods for high densityoligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, *19*(2), 185–193. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/19.2.185

Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Sathler, L. B., Brito-Moreira, J., Houzel, J. C., Decker, H., Silverman, M. A., Kazi, H., Melo, H. M., McClean, P. L., Holscher, C., Arnold, S. E., Talbot, K., Klein, W. L., Munoz, D. P., Ferreira, S. T., & De Felice, F. G. (2012). An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease–associated Aβ oligomers. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(4), 1339–1353. https://doi.org/10.1172/JCI57256

Bonfili, L., Cecarini, V., Gogoi, O., Gong, C., Cuccioloni, M., Angeletti, M., Rossi, G., & Eleuteri, A. M. (2021). Microbiota modulation as preventative and therapeutic approach in Alzheimer's disease. *The FEBS Journal*, *288*(9), 2836–2855. https://doi.org/10.1111/FEBS.15571

Bouvier, D. S., Fixemer, S., Heurtaux, T., Jeannelle, F., Frauenknecht, K. B. M., & Mittelbronn, M. (2022). The Multifaceted Neurotoxicity of Astrocytes in Ageing and Age-Related Neurodegenerative Diseases: A Translational Perspective. *Frontiers in Physiology*, *13*, 467. https://doi.org/10.3389/FPHYS.2022.814889/BIBTEX

Brave, F. den, & Becker, T. (2020). Supercomplex formation boosts respiration. *EMBO Reports*, *21*(12), e51830. https://doi.org/10.15252/EMBR.202051830

Bravo, R., Gutierrez, T., Paredes, F., Gatica, D., Rodriguez, A. E., Pedrozo, Z., Chiong, M., Parra, V., Quest, A. F. G., Rothermel, B. A., & Lavandero, S. (2012). Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *44*(1), 16–20. https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2011.10.012

Brawek, B., Chesters, R., Klement, D., Müller, J., Lerdkrai, C., Hermes, M., & Garaschuk, O. (2018). A bell-shaped dependence between amyloidosis and GABA accumulation in astrocytes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *61*, 187–197. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2017.09.028

Breitner, J. C., Baker, L. D., Montine, T. J., Meinert, C. L., Lyketsos, C. G., Ashe, K. H., Brandt, J., Craft, S., Evans, D. E., Green, R. C., Ismail, M. S., Martin, B. K., Mullan, M. J., Sabbagh, M., & Tariot, P. N. (2011). Extended results of the Alzheimer's disease anti-inflammatory prevention trial. *Alzheimer's & Dementia*, *7*(4), 402–411. https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2010.12.014

Breitner, J. C. S., & Zandi, P. P. (2009). Do Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs Reduce the Risk of Alzheimer's Disease? *Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM200111223452110*, *345*(21), 1567–1568. https://doi.org/10.1056/NEJM200111223452110

Broadhurst, D., Goodacre, R., Reinke, S. N., Kuligowski, J., Wilson, I. D., Lewis, M. R., & Dunn, W. B. (2018). Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics*, *14*(6), 72. https://doi.org/10.1007/S11306-018-1367-3

Broeckling, C. D., Afsar, F. A., Neumann, S., Ben-Hur, A., & Prenni, J. E. (2014). RAMClust: A novel feature clustering method enables spectral-matching-based annotation for metabolomics data. *Analytical Chemistry*, *86*(14), 6812–6817. https://doi.org/10.1021/AC501530D/SUPPL_FILE/AC501530D_SI_001.PDF

Bronzuoli, M. R., Iacomino, A., Steardo, L., & Scuderi, C. (2016). Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Journal of Inflammation Research*, *9*, 199–208. https://doi.org/10.2147/JIR.S86958

Brosseron, F., Krauthausen, M., Kummer, M., & Heneka, M. T. (2014). Body Fluid Cytokine Levels in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: a Comparative Overview. *Molecular Neurobiology*, *50*(2), 534–544. https://doi.org/10.1007/S12035-014-8657-1/FIGURES/1

Brown, K. J., Seol, H., Pillai, D. K., Sankoorikal, B. J., Formolo, C. A., Mac, J., Edwards, N. J., Rose, M. C., & Hathout, Y. (2013). The human secretome atlas initiative: Implications in health and disease conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1834*(11), 2454–2461. https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2013.04.007

Brown, M., Dunn, W. B., Dobson, P., Patel, Y., Winder, C. L., Francis-Mcintyre, S., Begley, P., Carroll, K., Broadhurst, D., Tseng, A., Swainston, N., Spasic, I., Goodacre, R., & Kell, D. B. (2009). Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. *Analyst*, *134*(7), 1322–1332. https://doi.org/10.1039/B901179J

Bryant, S., & Manning, D. L. (1998). Isolation of Messenger RNA. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *86*, 61–64. https://doi.org/10.1385/0-89603-494-1:61

Buffo, A., Rolando, C., & Ceruti, S. (2010). Astrocytes in the damaged brain: Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochemical Pharmacology*, *79*(2), 77–89. https://doi.org/10.1016/J.BCP.2009.09.014

Bullard, J. H., Purdom, E., Hansen, K. D., & Dudoit, S. (2010). Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics*, *11*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-94/FIGURES/8

Bullock, R. (2006). Efficacy and safety of memantine in moderate-to-severe Alzheimer disease: The evidence to date. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, *20*(1), 23–29. https://doi.org/10.1097/01.WAD.0000201847.29836.A5

Bundy, J. G., Davey, M. P., & Viant, M. R. (2008). Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics 2008 5:1*, *5*(1), 3–21. https://doi.org/10.1007/S11306-008-0152-0

Busche, M. A., & Konnerth, A. (2015). Neuronal hyperactivity – A key defect in Alzheimer's disease? *BioEssays*, *37*(6), 624–632. https://doi.org/10.1002/BIES.201500004

Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M., & Baker, D. J. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature 2018 562:7728*, *562*(7728), 578–582. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0543-y

Butte, A. J., Dzau, V. J., & Glueck, S. B. (2001). Further defining housekeeping, or "maintenance," genes Focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues." *Https://Doi.Org/10.1152/Physiolgenomics.2001.7.2.95*, *7*(2), 95–96. https://doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.2001.7.2.95

Buttini, M., Masliah, E., Yu, G. Q., Palop, J. J., Chang, S., Bernardo, A., Lin, C., Wyss-Coray, T., Huang, Y., & Mucke, L. (2010). Cellular source of apolipoprotein E4 determines neuronal susceptibility to excitotoxic injury in transgenic mice. *American Journal of Pathology*, *177*(2), 563–569. https://doi.org/10.2353/AJPATH.2010.090973/ATTACHMENT/E67499A3-2612-4D2C-BDE4-BDAC789E749B/MMC1.PDF

Cabili, M., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., & Rinn, J. L. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes & Development*, *25*(18), 1915–1927. https://doi.org/10.1101/GAD.17446611

Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Xing, Y., Lubischer, J. L., Krieg, P. A., Krupenko, S. A., Thompson, W. J., & Barres, B. A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. *Journal of Neuroscience*, *28*(1), 264–278. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008

Calfio, C., Gonzalez, A., Singh, S. K., Rojo, L. E., & MacCioni, R. B. (2020). The Emerging Role of Nutraceuticals and Phytochemicals in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *77*(1), 33–51. https://doi.org/10.3233/JAD-200443

Calvo, P., Pastor, A., & De La Cruz, R. (2018). Vascular endothelial growth factor: an essential neurotrophic factor for motoneurons? *Neural Regeneration Research*, *13*(7), 1181. https://doi.org/10.4103/1673-5374.235024

Campbell, S. L., Hablitz, J. J., & Olsen, M. L. (2014). Functional changes in glutamate transporters and astrocyte biophysical properties in a rodent model of focal cortical dysplasia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(DEC), 425. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00425/BIBTEX

Campisi, J., & D'Adda Di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2007 8:9*, *8*(9), 729–740. https://doi.org/10.1038/nrm2233

Canepa, E., Borghi, R., Via, J., Traverso, N., Gambini, J., Domenicotti, C., Marinari, U. M., Poli, G., Pronzato, M. A., & Ricciarelli, R. (2011). Cholesterol and Amyloid-β: Evidence for a Cross-Talk between Astrocytes and Neuronal Cells. *Journal of Alzheimer's Disease*, *25*(4), 645–653. https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110053

Carreno, G., Guiho, R., & Martinez-Barbera, J. P. (2021). Cell senescence in neuropathology: A focus on neurodegeneration and tumours. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *47*(3), 359–378. https://doi.org/10.1111/NAN.12689

Carroll, J. C., Rosario, E. R., Chang, L., Stanczyk, F. Z., Oddo, S., LaFerla, F. M., & Pike, C. J. (2007). Progesterone and Estrogen Regulate Alzheimer-Like Neuropathology in Female 3xTg-AD Mice. *Journal of Neuroscience*, *27*(48), 13357–13365. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2718-07.2007

Carvalho, D., Paulino, M., Polticelli, F., Arredondo, F., Williams, R. J. R. J., & Abin-Carriquiry, J. A. (2017). Structural evidence of quercetin multi-target bioactivity: A reverse virtual screening strategy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *106*, 393–403. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.028

Casamenti, F., Prosperi, C., Scali, C., Giovannelli, L., Colivicchi, M. A., Faussone-Pellegrini, M. S., & Pepeu, G. (1999). Interleukin-1β activates forebrain glial cells and increases nitric oxide production and cortical glutamate and GABA release in vivo: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *91*(3), 831–842. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00680-0

Casella, G., Munk, R., Kim, K. M., Piao, Y., De, S., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2019). Transcriptome signature of cellular senescence. *Nucleic Acids Research*, *47*(14), 7294–7305. https://doi.org/10.1093/nar/gkz555

Castellani, R. J., Lee, H. G., Siedlak, S. L., Nunomura, A., Hayashi, T., Nakamura, M., Zhu, X., Perry, G., & Smith, M. A. (2009). Reexamining Alzheimer's Disease: Evidence for a Protective Role for Amyloid-β Protein Precursor and Amyloid-β. *Journal of Alzheimer's Disease*, *18*(2), 447–452. https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1151

Castillo, S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L., & Orešič, M. (2011). Algorithms and tools for the preprocessing of LC–MS metabolomics data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *108*(1), 23–32. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2011.03.010

Cavanagh, C., Tse, Y. C., Nguyen, H. B., Krantic, S., Breitner, J. C. S., Quirion, R., & Wong, T. P. (2016). Inhibiting tumor necrosis factor-α before amyloidosis prevents synaptic deficits in an Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging*, *47*, 41–49. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2016.07.009

Cetin, S., Knez, D., Gobec, S., Kos, J., & Pišlar, A. (2022). Cell models for Alzheimer's and Parkinson's disease: At the interface of biology and drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *149*, 112924. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.112924

Chang, R., Yee, K.-L., & Sumbria, R. K. (2017). Tumor necrosis factor α Inhibition for Alzheimer's Disease. *Journal of Central Nervous System Disease*, *9*, 1179573517709278. https://doi.org/10.1177/1179573517709278

Chao, C. C., Gutiérrez-Vázquez, C., Rothhammer, V., Mayo, L., Wheeler, M. A., Tjon, E. C., Zandee, S. E. J., Blain, M., de Lima, K.

A., Takenaka, M. C., Avila-Pacheco, J., Hewson, P., Liu, L., Sanmarco, L. M., Borucki, D. M., Lipof, G. Z., Trauger, S. A., Clish, C. B., Antel, J. P., … Quintana, F. J. (2019). Metabolic Control of Astrocyte Pathogenic Activity via cPLA2-MAVS. *Cell*, *179*(7), 1483-1498.e22. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.11.016/ATTACHMENT/627104C4-886A-47B6-A5A6-FC081FF4791C/MMC1.PDF

Checler, F., & Alves Da Costa, C. (2014). p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers. *Pharmacology & Therapeutics*, *142*(1), 99–113. https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2013.11.009

Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, *14*, 450–464. https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2017.10.014

Chen, C., Krausz, K. W., Shah, Y. M., Idle, J. R., & Gonzalez, F. J. (2009). Serum metabolomics reveals irreversible inhibition of fatty acid β-oxidation through the suppression of PPARα activation as a contributing mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, *22*(4), 699–707. https://doi.org/10.1021/TX800464Q/SUPPL_FILE/TX800464Q_SI_001.PDF

Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica 2017 38:9*, *38*(9), 1205–1235. https://doi.org/10.1038/aps.2017.28

Chen, Geng, Ning, B., & Shi, T. (2019). Single-cell RNA-seq technologies and related computational data analysis. *Frontiers in Genetics*, *10*(APR), 317. https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.00317/BIBTEX

Chen, Geng, Wang, C., & Shi, T. L. (2012). Overview of available methods for diverse RNA-Seq data analyses. *Science China Life Sciences 2011 54:12*, *54*(12), 1121–1128. https://doi.org/10.1007/S11427-011-4255-X

Chen, Guodong, & Pramanik, B. N. (2009). Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects. *Drug Discovery Today*, *14*(9–10), 465–471. https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2009.02.007

Chen, Q., Samidurai, A., Thompson, J., Hu, Y., Das, A., Willard, B., & Lesnefsky, E. J. (2020). Endoplasmic reticulum stress-mediated mitochondrial dysfunction in aged hearts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1866*(11), 165899. https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165899

Chen, W., He, B., Tong, W., Zeng, J., & Zheng, P. (2019). Astrocytic insulin-like growth factor-1 protects neurons against excitotoxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*, 298. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00298/BIBTEX

Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M. B., Hatziapostolou, M., Lim, E., Tam, W. L., Ni, M., Chen, Y., Mai, J., Shen, H., Hu, D. Z., Adoro, S., Hu, B., Song, M., Tan, C., Landis, M. D., Ferrari, M., … Glimcher, L. H. (2014). XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1α pathway. *Nature 2014 508:7494*, *508*(7494), 103–107. https://doi.org/10.1038/nature13119

Chen, Y., Lun, A. T. L., & Smyth, G. K. (2016). From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Research*, *5*, 1438. https://doi.org/10.12688/f1000research.8987.2

Cheng, Y. Y., Zhao, H. K., Chen, L. W., Yao, X. Y., Wang, Y. L., Huang, Z. W., Li, G. P., Wang, Z., & Chen, B. Y. (2020). Reactive astrocytes increase expression of proNGF in the mouse model of contused spinal cord injury. *Neuroscience Research*, *157*, 34–43. https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2019.07.007

Chételat, G. (2013). Alzheimer disease: Aβ-independent processes-rethinking preclinical AD. *Nature Reviews. Neurology*, *9*(3), 123. https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2013.21

Chever, O., Pannasch, U., Ezan, P., & Rouach, N. (2014). Astroglial connexin 43 sustains glutamatergic synaptic efficacy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1654). https://doi.org/10.1098/RSTB.2013.0596

Chinchore, Y., Begaj, T., Wu, D., Drokhlyansky, E., & Cepko, C. L. (2017). Glycolytic reliance promotes anabolism in photoreceptors. *ELife*, *6*. https://doi.org/10.7554/ELIFE.25946

Chinta, S. J., Woods, G., Demaria, M., Rane, A., Zou, Y., McQuade, A., Rajagopalan, S., Limbad, C., Madden, D. T., Campisi, J., & Andersen, J. K. (2018). Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes

to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Reports*, *22*(4), 930–940. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.12.092/ATTACHMENT/C68D057F-8C79-4F9C-A04A-F9FB60B1076D/MMC1.PDF

Chiquita, S., Ribeiro, M., Castelhano, J., Oliveira, F., Sereno, J., Batista, M., Abrunhosa, A., Rodrigues-Neves, A. C., Carecho, R., Baptista, F., Gomes, C., Moreira, P. I., Ambrósio, A. F., & Castelo-Branco, M. (2019). A longitudinal multimodal in vivo molecular imaging study of the 3xTg-AD mouse model shows progressive early hippocampal and taurine loss. *Human Molecular Genetics*, *28*(13), 2174–2188. https://doi.org/10.1093/hmg/ddz045

Cho, J. K., Ryu, Y. B., Curtis-Long, M. J., Kim, J. Y., Kim, D., Lee, S., Lee, W. S., & Park, K. H. (2011). Inhibition and structural reliability of prenylated flavones from the stem bark of Morus lhou on β-secretase (BACE-1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *21*(10), 2945–2948. https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2011.03.060

Cho, J. M., Shin, Y.-J., Park, J.-M., Kim, J., & Lee, M.-Y. (2013). Characterization of nestin expression in astrocytes in the rat hippocampal CA1 region following transient forebrain ischemia. *Anatomy & Cell Biology*, *46*(2), 131. https://doi.org/10.5115/ACB.2013.46.2.131

Cho, Y. Y., Kwon, O. H., Park, M. K., Kim, T. W., & Chung, S. (2019). Elevated cellular cholesterol in Familial Alzheimer's presenilin 1 mutation is associated with lipid raft localization of β-amyloid precursor protein. *PLOS ONE*, *14*(1), e0210535. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0210535

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols 2006 1:2*, *1*(2), 581–585. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83

Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., & Gleichmann, M. (2009). An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *NeuroMolecular Medicine 2009 12:1*, *12*(1), 1–12. https://doi.org/10.1007/S12017-009-8104-Z

Chu, D. C. M., Penney, J. B., & Young, A. B. (1987). Quantitative autoradiography of hippocampal GABAB and GABAA receptor changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, *82*(3), 246–252. https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90264-3

Chun, H., An, H., Lim, J., Woo, J., Lee, J., Ryu, H., Lee, C. J., H, C., H, A., J, L. L., J, W., J, L. L., H, R., CJ, L., Chun, H., An, H., Lim, J., Woo, J., Lee, J., … CJ, L. (2018). Astrocytic proBDNF and Tonic GABA Distinguish Active versus Reactive Astrocytes in Hippocampus. *Experimental Neurobiology*, *27*(3), 155. https://doi.org/10.5607/EN.2018.27.3.155

Chung, H. Y., Kim, H. J., Kim, J. W., & Yu, B. P. (2001). The Inflammation Hypothesis of Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *928*(1), 327–335. https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2001.TB05662.X

Cirillo, C., Capoccia, E., Iuvone, T., Cuomo, R., Sarnelli, G., Steardo, L., & Esposito, G. (2015). S100B inhibitor pentamidine attenuates reactive gliosis and reduces neuronal loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/508342

Clarke, L. E., Liddelow, S. A., Chakraborty, C., Münch, A. E., Heiman, M., & Barres, B. A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(8), E1896–E1905. https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115

Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., & Ashe, K. H. (2004). Natural oligomers of the amyloid-β protein specifically disrupt cognitive function. *Nature Neuroscience 2004 8:1*, *8*(1), 79–84. https://doi.org/10.1038/nn1372

Colca, J. R., McDonald, W. G., Cavey, G. S., Cole, S. L., Holewa, D. D., Brightwell-Conrad, A. S., Wolfe, C. L., Wheeler, J. S., Coulter, K. R., Kilkuskie, P. M., Gracheva, E., Korshunova, Y., Trusgnich, M., Karr, R., Wiley, S. E., Divakaruni, A. S., Murphy, A. N., Vigueira, P. A., Finck, B. N., & Kletzien, R. F. (2013). Identification of a Mitochondrial Target of Thiazolidinedione Insulin Sensitizers (mTOT)—Relationship to Newly Identified Mitochondrial Pyruvate Carrier Proteins. *PLOS ONE*, *8*(5), e61551. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061551

Coll, R. C., Hill, J. R., Day, C. J., Zamoshnikova, A., Boucher, D., Massey, N. L., Chitty, J. L., Fraser, J. A., Jennings, M. P., Robertson, A. A. B., & Schroder, K. (2019). MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nature Chemical Biology 2019 15:6*, *15*(6), 556–559. https://doi.org/10.1038/s41589-019-0277-7

Colombo, J. A., Quinn, B., & Puissant, V. (2002). Disruption of astroglial interlaminar processes in Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, *58*(2), 235–242. https://doi.org/10.1016/S0361-9230(02)00785-2

Combs, C. K., Colleen Karlo, J., Kao, S. C., & Landreth, G. E. (2001). β-Amyloid Stimulation of Microglia and Monocytes Results in TNFα-Dependent Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Neuronal Apoptosis. *Journal of Neuroscience*, *21*(4), 1179–1188. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-04-01179.2001

Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, *21*(18), 3674–3676. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTI610

Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szcześniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., Zhang, X., & Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology 2016 17:1*, *17*(1), 1–19. https://doi.org/10.1186/S13059-016-0881-8

Conforti, L., Adalbert, R., & Coleman, M. P. (2007). Neuronal death: where does the end begin? *Trends in Neurosciences*, *30*(4), 159–166. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2007.02.004

Cormenier, J., Martin, N., Deslé, J., Salazar-Cardozo, C., Pourtier, A., Abbadie, C., & Pluquet, O. (2018). The ATF6α arm of the Unfolded Protein Response mediates replicative senescence in human fibroblasts through a COX2/prostaglandin E2 intracrine pathway. *Mechanisms of Ageing and Development*, *170*, 82–91. https://doi.org/10.1016/J.MAD.2017.08.003

Correia-Melo, C., Marques, F. D., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B. M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., Rushton, M. D., Charles, M., Jurk, D., Tait, S. W., Czapiewski, R., Greaves, L., Nelson, G., Bohlooly-Y, M., Rodriguez-Cuenca, S., … Passos, J. F. (2016). Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *The EMBO Journal*, *35*(7), 724–742. https://doi.org/10.15252/EMBJ.201592862

Corsinovi, L., Biasi, F., Poli, G., Leonarduzzi, G., & Isaia, G. (2011). Dietary lipids and their oxidized products in Alzheimer's disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*(S2), S161-SS172. https://doi.org/10.1002/MNFR.201100208

Craft, S., Baker, L. D., Montine, T. J., Minoshima, S., Watson, G. S., Claxton, A., Arbuckle, M., Callaghan, M., Tsai, E., Plymate, S. R., Green, P. S., Leverenz, J., Cross, D., & Gerton, B. (2012). Intranasal Insulin Therapy for Alzheimer Disease and Amnestic Mild Cognitive Impairment: A Pilot Clinical Trial. *Archives of Neurology*, *69*(1), 29–38. https://doi.org/10.1001/ARCHNEUROL.2011.233

Crescenzi, R., DeBrosse, C., Nanga, R. P. R., Byrne, M. D., Krishnamoorthy, G., D'Aquilla, K., Nath, H., Morales, K. H., Iba, M., Hariharan, H., Lee, V. M. Y., Detre, J. A., & Reddy, R. (2017). Longitudinal imaging reveals subhippocampal dynamics in glutamate levels associated with histopathologic events in a mouse model of tauopathy and healthy mice. *Hippocampus*, *27*(3), 285–302. https://doi.org/10.1002/HIPO.22693

Cristóvaõ, J. S., & Gomes, C. M. (2019). S100 Proteins in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, *13*(MAY), 463.

Crowe, A., Huang, W., Ballatore, C., Johnson, R. L., Hogan, A. M. L., Huang, R., Wichterman, J., McCoy, J., Huryn, D., Auld, D. S., Smith, A. B., Inglese, J., Trojanowski, J. Q., Austin, C. P., Brunden, K. R., & Lee, V. M. Y. (2009). Identification of aminothienopyridazine inhibitors of tau assembly by quantitative high-throughput screening. *Biochemistry*, *48*(32), 7732–7745. https://doi.org/10.1021/BI9006435/ASSET/IMAGES/BI9006435.SOCIAL.JPEG_V03

Crowe, E. P., Tuzer, F., Gregory, B. D., Donahue, G., Gosai, S. J., Cohen, J., Leung, Y. Y., Yetkin, E., Nativio, R., Wang, L. S., Sell, C., Bonini, N. M., Berger, S. L., Brad Johnson, F., & Torres, C. (2016). Changes in the transcriptome of human astrocytes accompanying oxidative stress-induced senescence. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *8*(AUG), 208. https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00208

Csardi, G., & Nepusz, T. (2005). The Igraph Software Package for Complex Network Research. *InterJournal*, *Complex Sy*, 1695.

Cui, Q., Lewis, I. A., Hegeman, A. D., Anderson, M. E., Li, J., Schulte, C. F., Westler, W. M., Eghbalnia, H. R., Sussman, M. R., & Markley, J. L. (2008). Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nature Biotechnology 2008 26:2*, *26*(2), 162–164. https://doi.org/10.1038/nbt0208-162

Cummings, J. L., Morstorf, T., & Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: Few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Research and Therapy*, *6*(4), 1–7. https://doi.org/10.1186/ALZRT269/TABLES/3

Cummings, J., Lee, G., Zhong, K., Fonseca, J., & Taghva, K. (2021). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, *7*(1), e12179. https://doi.org/10.1002/TRC2.12179

Cunnane, S. C., Schneider, J. A., Tangney, C., Tremblay-Mercier, J., Fortier, M., Bennett, D. A., & Morris, M. C. (2012). Plasma and Brain Fatty Acid Profiles in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *29*(3), 691–697. https://doi.org/10.3233/JAD-2012-110629

Cunnane, S., Nugent, S., Roy, M., Courchesne-Loyer, A., Croteau, E., Tremblay, S., Castellano, A., Pifferi, F., Bocti, C., Paquet, N., Begdouri, H., Bentourkia, M., Turcotte, E., Allard, M., Barberger-Gateau, P., Fulop, T., & Rapoport, S. I. (2011). Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition*, *27*(1), 3–20. https://doi.org/10.1016/J.NUT.2010.07.021

Cutler, R. G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W. A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J. C., & Mattson, M. P. (2004). Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(7), 2070–2075. https://doi.org/10.1073/PNAS.0305799101

Dabir, D. V., Robinson, M. B., Swanson, E., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., & Forman, M. S. (2006). Impaired Glutamate Transport in a Mouse Model of Tau Pathology in Astrocytes. *Journal of Neuroscience*, *26*(2), 644–654. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3861-05.2006

Dafinca, R., Barbagallo, P., & Talbot, K. (2021). The Role of Mitochondrial Dysfunction and ER Stress in TDP-43 and C9ORF72 ALS. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *15*, 97. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2021.653688/BIBTEX

Dai, M., Thompson, R. C., Maher, C., Contreras-Galindo, R., Kaplan, M. H., Markovitz, D. M., Omenn, G., & Meng, F. (2010). NGSQC: Cross-platform quality analysis pipeline for deep sequencing data. *BMC Genomics*, *11*(SUPPL. 4), 1–9. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-S4-S7/FIGURES/4

Dai, X., & Shen, L. (2022). Advances and Trends in Omics Technology Development. *Frontiers in Medicine*, *9*, 1546. https://doi.org/10.3389/FMED.2022.911861/BIBTEX

Dall'lgna, O. P., Porciúncula, L. O., Souza, D. O., Cunha, R. A., & Lara, D. R. (2003). Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of β-amyloid neurotoxicity. *British Journal of Pharmacology*, *138*(7), 1207–1209. https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0705185

Daly, R., Rogers, S., Wandy, J., Jankevics, A., Burgess, K. E. V., & Breitling, R. (2014). MetAssign: probabilistic annotation of metabolites from LC–MS data using a Bayesian clustering approach. *Bioinformatics*, *30*(19), 2764–2771. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU370

Daniels, M. J. D., Rivers-Auty, J., Schilling, T., Spencer, N. G., Watremez, W., Fasolino, V., Booth, S. J., White, C. S., Baldwin, A. G., Freeman, S., Wong, R., Latta, C., Yu, S., Jackson, J., Fischer, N., Koziel, V., Pillot, T., Bagnall, J., Allan, S. M., … Brough, D. (2016). Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models. *Nature Communications 2016 7:1*, *7*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/ncomms12504

Das, M. M., & Svendsen, C. N. (2015). Astrocytes show reduced support of motor neurons with aging that is accelerated in a rodent model of ALS. *Neurobiology of Aging*, *36*(2), 1130–1139. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2014.09.020

Das, P., Howard, V., Loosbrock, N., Dickson, D., Murphy, M. P., & Golde, T. E. (2003). Amyloid-β Immunization Effectively Reduces Amyloid Deposition in FcRγ-/- Knock-Out Mice. *Journal of Neuroscience*, *23*(24), 8532–8538. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-24-08532.2003

Davies, C. A., Mann, D. M. A., Sumpter, P. Q., & Yates, P. O. (1987). A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, *78*(2), 151–164. https://doi.org/10.1016/0022-510X(87)90057-8

Davis, I., & Liu, A. (2015). What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapeutics? *Http://Dx.Doi.Org/10.1586/14737175.2015.1049999*, *15*(7), 719–721. https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1049999

Davis, R. A., Charlton, A. J., Godward, J., Jones, S. A., Harrison, M., & Wilson, J. C. (2007). Adaptive binning: An improved

binning method for metabolomics data using the undecimated wavelet transform. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *85*(1), 144–154. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2006.08.014

Day, G. S., Scarmeas, N., Dubinsky, R., Coerver, K., Mostacero, A., West, B., Wessels, S. R., & Armstrong, M. J. (2021). *Aducanumab Use in Symptomatic Alzheimer Disease Evidence in Focus A Report of the AAN Guidelines Subcommittee*. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000200176

De Falco, E., Porcelli, D., Torella, A. R., Straino, S., Iachininoto, M. G., Orlandi, A., Truffa, S., Biglioli, P., Napolitano, M., Capogrossi, M. C., & Pesce, M. (2004). SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood*, *104*(12), 3472–3482. https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-12-4423

de Jong, D., Jansen, R., Hoefnagels, W., Jellesma-Eggenkamp, M., Verbeek, M., Borm, G., & Kremer, B. (2008). No Effect of One-Year Treatment with Indomethacin on Alzheimer's Disease Progression: A Randomized Controlled Trial. *PLOS ONE*, *3*(1), e1475. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0001475

de la Monte, S. M., Re, E., Longato, L., & Tong, M. (2012). Dysfunctional Pro-Ceramide, ER Stress, and Insulin/IGF Signaling Networks with Progression of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *30*(s2), S217–S229. https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111728

De La Monte, S. M., Tong, M., Lester-Coll, N., Plater, M., & Wands, J. R. (2006). Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: Relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *10*(1), 89–109. https://doi.org/10.3233/JAD-2006-10113

De la Rosa, A., Olaso-Gonzalez, G., Arc-Chagnaud, C., Millan, F., Salvador-Pascual, A., García-Lucerga, C., Blasco-Lafarga, C., Garcia-Dominguez, E., Carretero, A., Correas, A. G., Viña, J., & Gomez-Cabrera, M. C. (2020). Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. In *Journal of Sport and Health Science* (Vol. 9, Issue 5, pp. 394–404). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.01.004

De Strooper, B., & Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*, *164*(4), 603–615. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.12.056

Deane, R., & Zlokovic, B. (2007). Role of the Blood-Brain Barrier in the Pathogenesis of Alzheimers Disease. *Current Alzheimer Research*, *4*(2), 191–197. https://doi.org/10.2174/156720507780362245

Decourt, B., Wilson, J., Ritter, A., Dardis, C., Difilippo, F. P., Zhuang, X., Cordes, D., Lee, G., Fulkerson, N. D., Rose, T. S., Hartley, K., & Sabbagh, M. N. (2020). MCLENA-1: A Phase II Clinical Trial for the Assessment of Safety, Tolerability, and Efficacy of Lenalidomide in Patients with Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer’s Disease . *Open Access Journal of Clinical Trials*, *12*, 1–13. https://doi.org/10.2147/OAJCT.S221914

DeKosky, S. T., & Scheff, S. W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Annals of Neurology*, *27*(5), 457–464. https://doi.org/10.1002/ANA.410270502

DeMattos, R. B., Bales, K. R., Cummins, D. J., Dodart, J. C., Paul, S. M., & Holtzman, D. M. (2001). Peripheral anti-Aβ antibody alters CNS and plasma Aβ clearance and decreases brain Aβ burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(15), 8850–8855. https://doi.org/10.1073/PNAS.151261398/ASSET/A61AF857-8A16-4BA5-B90C-1B73743E2FF7/ASSETS/GRAPHIC/PQ1512613004.JPEG

Dempsey, C., Rubio Araiz, A., Bryson, K. J., Finucane, O., Larkin, C., Mills, E. L., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., O'Neill, L. A. J., & Lynch, M. A. (2017). Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid-β and cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *61*, 306–316. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2016.12.014

Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., & Lempicki, R. A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology*, *4*(5), P3. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734009

Deo, R. C., Hunter, L., Lewis, G. D., Pare, G., Vasan, R. S., Chasman, D., Wang, T. J., Gerszten, R. E., & Roth, F. P. (2010). Interpreting Metabolomic Profiles using Unbiased Pathway Models. *PLOS Computational Biology*, *6*(2), e1000692. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1000692

Dermietzel, R., Traub, O., Hwang, T. K., Beyer, E., Bennett, M. V. L., Spray, D. C., & Willecke, K. (1989). Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(24), 10148–10152. https://doi.org/10.1073/PNAS.86.24.10148

Derous, D., Mitchell, S. E., Green, C. L., Wang, Y., Han, J. D. J., Chen, L., Promislow, D. E. L., Lusseau, D., Douglas, A., & Speakman, J. R. (2018). The Effects of Graded Levels of Calorie Restriction: X. Transcriptomic Responses of Epididymal Adipose Tissue. *The Journals of Gerontology: Series A*, *73*(3), 279–288. https://doi.org/10.1093/GERONA/GLX101

Desai, M. K., Mastrangelo, M. A., Ryan, D. A., Sudol, K. L., Narrow, W. C., & Bowers, W. J. (2010). Early Oligodendrocyte/Myelin Pathology in Alzheimer's Disease Mice Constitutes a Novel Therapeutic Target. *The American Journal of Pathology*, *177*(3), 1422–1435. https://doi.org/10.2353/AJPATH.2010.100087

Desai, M. K., Sudol, K. L., Janelsins, M. C., Mastrangelo, M. A., Frazer, M. E., & Bowers, W. J. (2009). Triple-transgenic Alzheimer's disease mice exhibit region-specific abnormalities in brain myelination patterns prior to appearance of amyloid and tau pathology. *Glia*, *57*(1), 54–65. https://doi.org/10.1002/GLIA.20734

Dettmer, K., Aronov, P. A., & Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, *26*(1), 51–78. https://doi.org/10.1002/MAS.20108

Deture, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration 2019 14:1*, *14*(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/S13024-019-0333-5

Devarajan, P. (2007). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: new paths for an old shuttle. *Cancer Therapy*, *5*(B), 463. /pmc/articles/PMC2361391/

Devi, L., Prabhu, B. M., Galati, D. F., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2006). Accumulation of Amyloid Precursor Protein in the Mitochondrial Import Channels of Human Alzheimer's Disease Brain Is Associated with Mitochondrial Dysfunction. *Journal of Neuroscience*, *26*(35), 9057–9068. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1469-06.2006

Di Giorgio, F. P., Boulting, G. L., Bobrowicz, S., & Eggan, K. C. (2008). Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell*, *3*(6), 637–648. https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.09.017

Di Giorgio, F. P., Carrasco, M. A., Siao, M. C., Maniatis, T., & Eggan, K. (2007). Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nature Neuroscience*, *10*(5), 608–614. https://doi.org/10.1038/NN1885

Di Muzio, E., Toti, D., & Polticelli, F. (2017). DockingApp: a user friendly interface for facilitated docking simulations with AutoDock Vina. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *31*(2), 213–218. https://doi.org/10.1007/s10822-016-0006-1

Diaz-Amarilla, P., Arredondo, F., Dapueto, R., Boix, V., Carvalho, D., Santi, M. D., Vasilskis, E., Mesquita-Ribeiro, R., Dajas-Bailador, F., Abin-Carriquiry, J. A., Engler, H., & Savio, E. (2022). Isolation and characterization of neurotoxic astrocytes derived from old triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Neurochemistry International*, *159*. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105403

Díaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trias, E., Cragnolini, A., Martínez-Palma, L., Cassina, P., Beckman, J., & Barbeito, L. (2011). Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(44), 18126–18131. https://doi.org/10.1073/pnas.1110689108

Dickson, D. W., Crystal, H. A., Bevona, C., Honer, W., Vincent, I., & Davies, P. (1995). Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiology of Aging*, *16*(3), 285–298. https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00013-5

Dimitrov, M., Alattia, J. R., Lemmin, T., Lehal, R., Fligier, A., Houacine, J., Hussain, I., Radtke, F., Dal Peraro, M., Beher, D., & Fraering, P. C. (2013). Alzheimers disease mutations in APP but not 3-secretase modulators affect epsilon-cleavage-dependent AICD production. *Nature Communications*, *4*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/ncomms3246

Divakaruni, A. S., Wiley, S. E., Rogers, G. W., Andreyev, A. Y., Petrosyan, S., Loviscach, M., Wall, E. A., Yadava, N., Heuck, A. P., Ferrick, D. A., Henry, R. R., McDonald, W. G., Colca, J. R., Simon, M. I., Ciaraldi, T. P., & Murphy, A. N. (2013). Thiazolidinediones are acute, specific inhibitors of the mitochondrial pyruvate carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(14), 5422–5427. https://doi.org/10.1073/PNAS.1303360110/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201303360SI.PDF

Dodart, J. C., Bales, K. R., Gannon, K. S., Greene, S. J., DeMattos, R. B., Mathis, C., DeLong, C. A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D. M., & Paul, S. M. (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain Aβ burden in Alzheimer's disease model. *Nature Neuroscience 2002 5:5*, *5*(5), 452–457. https://doi.org/10.1038/nn842

Domeniconi, M., Hempstead, B. L., & Chao, M. V. (2007). Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *34*(2), 271–279. https://doi.org/10.1016/J.MCN.2006.11.005

Dong, H., Rowland, I., Thomas, L. V., & Yaqoob, P. (2013). Immunomodulatory effects of a probiotic drink containing Lactobacillus casei Shirota in healthy older volunteers. *European Journal of Nutrition 2013 52:8*, *52*(8), 1853–1863. https://doi.org/10.1007/S00394-012-0487-1

Dong, Y., & Brewer, G. J. (2019). Global Metabolic Shifts in Age and Alzheimer's Disease Mouse Brains Pivot at NAD +/NADH Redox Sites. *Journal of Alzheimer's Disease*, *71*(1), 119–140. https://doi.org/10.3233/JAD-190408

Dorling, J. L., Martin, C. K., & Redman, L. M. (2020). Calorie restriction for enhanced longevity: The role of novel dietary strategies in the present obesogenic environment. *Ageing Research Reviews*, *64*, 101038. https://doi.org/10.1016/J.ARR.2020.101038

Dossi, E., Vasile, F., & Rouach, N. (2018). Human astrocytes in the diseased brain. *Brain Research Bulletin*, *136*, 139–156. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2017.02.001

Draghici, S., Khatri, P., Tarca, A. L., Amin, K., Done, A., Voichita, C., Georgescu, C., & Romero, R. (2007). A systems biology approach for pathway level analysis. *Genome Research*, *17*(10), 1537–1545. https://doi.org/10.1101/GR.6202607

Duarte, N. C., Becker, S. A., Jamshidi, N., Thiele, I., Mo, M. L., Vo, T. D., Srivas, R., & Palsson, B. (2007). Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(6), 1777–1782. https://doi.org/10.1073/PNAS.0610772104/SUPPL_FILE/10772FIG20.JPG

Dunn, W. B., Erban, A., Weber, R. J. M., Creek, D. J., Brown, M., Breitling, R., Hankemeier, T., Goodacre, R., Neumann, S., Kopka, J., & Viant, M. R. (2012). Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics 2012 9:1*, *9*(1), 44–66. https://doi.org/10.1007/S11306-012-0434-4

Duran-Aniotz, C., Cornejo, V. H., Espinoza, S., Ardiles, Á. O., Medinas, D. B., Salazar, C., Foley, A., Gajardo, I., Thielen, P., Iwawaki, T., Scheper, W., Soto, C., Palacios, A. G., Hoozemans, J. J. M., & Hetz, C. (2017). IRE1 signaling exacerbates Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathologica 2017 134:3*, *134*(3), 489–506. https://doi.org/10.1007/S00401-017-1694-X

Durbin, B. P., Hardin, J. S., Hawkins, D. M., & Rocke, D. M. (2002). A variance-stabilizing transformation for gene-expressionmicroarray data. *Bioinformatics*, *18*(suppl_1), S105–S110. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/18.SUPPL_1.S105

Echeverry, C., Arredondo, F., Abin-Carriquiry, J. A., Midiwo, J. O., Ochieng, C., Kerubo, L., & Dajas, F. (2010). Pretreatment with natural flavones and neuronal cell survival after oxidative stress: a structure-activity relationship study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(4), 2111–2115. https://doi.org/10.1021/jf902951v

Efron, B., & Tibshirani, R. (2007). On testing the significance of sets of genes. *Https://Doi.Org/10.1214/07-AOAS101*, *1*(1), 107–129. https://doi.org/10.1214/07-AOAS101

Efthymiou, A. G., & Goate, A. M. (2017). Late onset Alzheimer's disease genetics implicates microglial pathways in disease risk. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/S13024-017-0184-X/FIGURES/2

Ehrnhoefer, D. E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A., & Wanker, E. E. (2008). EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nature Structural & Molecular Biology 2008 15:6*, *15*(6), 558–566. https://doi.org/10.1038/nsmb.1437

Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2003). Human housekeeping genes are compact. *Trends in Genetics*, *19*(7), 362–365. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00140-9

Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*, *29*(10), 569–574. https://doi.org/10.1016/J.TIG.2013.05.010

El-Sharkawy, L. Y., Brough, D., & Freeman, S. (2020). Inhibiting the NLRP3 Inflammasome. *Molecules 2020, Vol. 25, Page 5533*, *25*(23), 5533. https://doi.org/10.3390/MOLECULES25235533

Elsallabi, O., Patruno, A., Pesce, M., Cataldi, A., Carradori, S., & Gallorini, M. (2022). Fisetin as a Senotherapeutic Agent: Biopharmaceutical Properties and Crosstalk between Cell Senescence and Neuroprotection. *Molecules 2022, Vol. 27, Page 738*, *27*(3), 738. https://doi.org/10.3390/MOLECULES27030738

Engler, H., Forsberg, A., Almkvist, O., Blomquist, G., Larsson, E., Savitcheva, I., Wall, A., Ringheim, A., Långström, B., & Nordberg, A. (2006). Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain*, *129*(11), 2856–2866. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWL178

Enright, A. J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C., & Marks, D. S. (2003). MicroRNA targets in Drosophila. *Genome Biology*, *5*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/GB-2003-5-1-R1/TABLES/6

Eriksson, L., Johansson, E., Antti, H., & Holmes, E. (2005). *Multi- and Megavariate Data Analysis* (pp. 263–336). https://doi.org/10.1201/b14117-9

Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., … Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. In *Nature Neuroscience* (Vol. 24, Issue 3, pp. 312–325). Nature Research. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4

Esposito, Z., Belli, L., Toniolo, S., Sancesario, G., Bianconi, C., & Martorana, A. (2013). Amyloid β, Glutamate, Excitotoxicity in Alzheimer's Disease: Are We on the Right Track? *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *19*(8), 549–555. https://doi.org/10.1111/CNS.12095

European Open Science Cloud. (2016). *Nature Genetics 2016 48:8*, *48*(8), 821–821. https://doi.org/10.1038/ng.3642

Evans, H. M., Howe, P. R. C., & Wong, R. H. X. (2017). Effects of Resveratrol on Cognitive Performance, Mood and Cerebrovascular Function in Post-Menopausal Women; A 14-Week Randomised Placebo-Controlled Intervention Trial. *Nutrients 2017, Vol. 9, Page 27*, *9*(1), 27. https://doi.org/10.3390/NU9010027

Evinova, A., Hatokova, Z., Tatarkova, Z., Brodnanova, M., Dibdiakova, K., & Racay, P. (2022). Endoplasmic reticulum stress induces mitochondrial dysfunction but not mitochondrial unfolded protein response in SH-SY5Y cells. *Molecular and Cellular Biochemistry 2021 477:3*, *477*(3), 965–975. https://doi.org/10.1007/S11010-021-04344-6

Fafián-Labora, J. A., & O'Loghlen, A. (2020). Classical and Nonclassical Intercellular Communication in Senescence and Ageing. *Trends in Cell Biology*, *30*(8), 628–639. https://doi.org/10.1016/J.TCB.2020.05.003

Fagan, S. G., Bechet, S., & Dev, K. K. (2022). Fingolimod Rescues Memory and Improves Pathological Hallmarks in the 3xTg-AD Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, *59*(3), 1882–1895. https://doi.org/10.1007/S12035-021-02613-5

Fahnestock, M., & Shekari, A. (2019). ProNGF and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, *13*(FEB), 129. https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.00129/BIBTEX

Fährrolfes, R., Bietz, S., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., Otto, T., Volkamer, A., & Rarey, M. (2017). Proteins Plus: A web portal for structure analysis of macromolecules. *Nucleic Acids Research*, *45*(W1), W337–W343. https://doi.org/10.1093/nar/gkx333

Fahy, E., Sud, M., Cotter, D., & Subramaniam, S. (2007). LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Research*, *35*(suppl_2), W606–W612. https://doi.org/10.1093/NAR/GKM324

Falcon, B., Zhang, W., Schweighauser, M., Murzin, A. G., Vidal, R., Garringer, H. J., Ghetti, B., Scheres, S. H. W., & Goedert, M. (2018). Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold. *Acta*

Neuropathologica, *136*(5), 699–708. https://doi.org/10.1007/S00401-018-1914-Z/FIGURES/5

Fang, J., Zhang, P., Wang, Q., Chiang, C. W., Zhou, Y., Hou, Y., Xu, J., Chen, R., Zhang, B., Lewis, S. J., Leverenz, J. B., Pieper, A. A., Li, B., Li, L., Cummings, J., & Cheng, F. (2022). Artificial intelligence framework identifies candidate targets for drug repurposing in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, *14*(1), 1–23. https://doi.org/10.1186/S13195-021-00951-Z/METRICS

Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E. A., Frosch, M. P., Eckman, C. B., Tanzi, R. E., Selkoe, D. J., & Guénette, S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β-protein, and the β-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), 4162–4167. https://doi.org/10.1073/PNAS.0230450100/SUPPL_FILE/0450FIG4.PDF

Felsenstein, K. M., Candelario, K. M., Steindler, D. A., & Borchelt, D. R. (2014). Regenerative medicine in Alzheimer's disease. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *163*(4), 432–438. https://doi.org/10.1016/J.TRSL.2013.11.001

Feng, X., Zhang, W., Kuipers, F., Kema, I., Barcaru, A., & Horvatovich, P. (2021). Dynamic binning peak detection and assessment of various lipidomics liquid chromatography-mass spectrometry pre-processing platforms. *Analytica Chimica Acta*, *1173*, 338674. https://doi.org/10.1016/J.ACA.2021.338674

Fernandez, J. W., Rezai-Zadeh, K., Obregon, D., & Tan, J. (2010). EGCG functions through estrogen receptor-mediated activation of ADAM10 in the promotion of non-amyloidogenic processing of APP. *FEBS Letters*, *584*(19), 4259–4267. https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2010.09.022

Ferreira, S. T., Clarke, J. R., Bomfim, T. R., & De Felice, F. G. (2014). Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *10*(1), S76–S83. https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2013.12.010

Ferrucci, L., & Fabbri, E. (2018). Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nature Reviews Cardiology 2018 15:9*, *15*(9), 505–522. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0064-2

Fiebich, B. L., Batista, C. R. A., Saliba, S. W., Yousif, N. M., & de Oliveira, A. C. P. (2018). Role of microglia TLRs in neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 329. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00329/BIBTEX

Fiehn, O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*, *2*(3), 155–168. https://doi.org/10.1002/CFG.82

Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E. L. L., Tate, J., & Punta, M. (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D222–D230. https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1223

Flanders, K. C., Lippa, C. F., Smith, T. W., Pollen, D. A., & Sporn, M. B. (1995). Altered expression of transforming growth factor-beta in Alzheimer's disease. *Neurology*, *45*(8), 1561–1569. https://doi.org/10.1212/WNL.45.8.1561

Flores-Cuadra, J. A., Madrid, A., Fernández, P. L., Pérez-Lao, A. R., Oviedo, Di. C., Britton, G. B., & Carreira, M. B. (2021). Critical Review of the Alzheimer's Disease Non-Transgenic Models: Can They Contribute to Disease Treatment? *Journal of Alzheimer's Disease*, *82*(s1), S227–S250. https://doi.org/10.3233/JAD-200870

Forrester, L. T., Maayan, N., Orrell, M., Spector, A. E., Buchan, L. D., & Soares-Weiser, K. (2014). Aromatherapy for dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2014*(2). https://doi.org/10.1002/14651858.CD003150.PUB2/MEDIA/CDSR/CD003150/REL0002/CD003150/

Francesco, A. Di, Germanio, C. Di, Bernier, M., & Cabo, R. de. (2018). A time to fast. *Science*. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAU2095

Franklin, D. A., He, Y., Leslie, P. L., Tikunov, A. P., Fenger, N., MacDonald, J. M., & Zhang, Y. (2016). p53 coordinates DNA repair with nucleotide synthesis by suppressing PFKFB3 expression and promoting the pentose phosphate pathway. *Scientific Reports 2016 6:1*, *6*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/srep38067

Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C. I., Choquet, D., & Gundelfinger, E. D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nature Neuroscience 2009 12:7*,

12(7), 897–904. https://doi.org/10.1038/nn.2338

Froehlich, H., Fellmann, M., Sueltmann, H., Poustka, A., & Beissbarth, T. (2007). Large scale statistical inference of signaling pathways from RNAi and microarray data. *BMC Bioinformatics*, *8*. https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-386

Froestl, W., Gallagher, M., Jenkins, H., Madrid, A., Melcher, T., Teichman, S., Mondadori, C. G., & Pearlman, R. (2004). SGS742: the first GABAB receptor antagonist in clinical trials. *Biochemical Pharmacology*, *68*(8), 1479–1487. https://doi.org/10.1016/J.BCP.2004.07.030

Fuchs, S. B. A., Lieder, I., Stelzer, G., Mazor, Y., Buzhor, E., Kaplan, S., Bogoch, Y., Plaschkes, I., Shitrit, A., Rappaport, N., Kohn, A., Edgar, R., Shenhav, L., Safran, M., Lancet, D., Guan-Golan, Y., Warshawsky, D., & Shtrichman, R. (2016). GeneAnalytics: An Integrative Gene Set Analysis Tool for Next Generation Sequencing, RNAseq and Microarray Data. *Omics : A Journal of Integrative Biology*, *20*(3), 139–151. https://doi.org/10.1089/OMI.2015.0168

Fukasawa, H., Nakagomi, M., Yamagata, N., Katsuki, H., Kawahara, K., Kitaoka, K., Miki, T., & Shudo, K. (2012). Tamibarotene: A Candidate Retinoid Drug for Alzheimer's Disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *35*(8), 1206–1212. https://doi.org/10.1248/BPB.B12-00314

Funato, H., Yoshimura, M., Yamazaki, T., Saido, T. C., Ito, Y., Yokofujita, J., Okeda, R., & Ihara, Y. (1998). Astrocytes containing amyloid beta-protein (Abeta)-positive granules are associated with Abeta40-positive diffuse plaques in the aged human brain. *The American Journal of Pathology*, *152*(4), 983. /pmc/articles/PMC1858251/?report=abstract

Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M., Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., & Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine 2019 25:12*, *25*(12), 1822–1832. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0

Furman, J. L., Sama, D. M., Gant, J. C., Beckett, T. L., Murphy, M. P., Bachstetter, A. D., van Eldik, L. J., & Norris, C. M. (2012). Targeting Astrocytes Ameliorates Neurologic Changes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, *32*(46), 16129–16140. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2323-12.2012

Gabbita, S. P., Srivastava, M. K., Eslami, P., Johnson, M. F., Kobritz, N. K., Tweedie, D., Greig, N. H., Zemlan, F. P., Sharma, S. P., & Harris-White, M. E. (2012). Early intervention with a small molecule inhibitor for tumor nefosis factor-α prevents cognitive deficits in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-99/TABLES/1

Ganguli, M. (2015). Cancer and dementia. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, *29*(2), 177–182. https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000086

Gansemer, E. R., McCommis, K. S., Martino, M., King-McAlpin, A. Q., Potthoff, M. J., Finck, B. N., Taylor, E. B., & Rutkowski, D. T. (2020). NADPH and Glutathione Redox Link TCA Cycle Activity to Endoplasmic Reticulum Homeostasis. *IScience*, *23*(5), 101116. https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2020.101116

Gao, Q., Li, Y., & Chopp, M. (2005). Bone marrow stromal cells increase astrocyte survival via upregulation of phosphoinositide 3-kinase/threonine protein kinase and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and stimulate astrocyte trophic factor gene expression after anaerobic insult. *Neuroscience*, *136*(1), 123–134. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2005.06.091

Garber, C., Vasek, M. J., Vollmer, L. L., Sun, T., Jiang, X., & Klein, R. S. (2018). Astrocytes decrease adult neurogenesis during virus-induced memory dysfunction via IL-1. *Nature Immunology*, *19*(2), 151–161. https://doi.org/10.1038/S41590-017-0021-Y

Gardner, P. P., Daub, J., Tate, J. G., Nawrocki, E. P., Kolbe, D. L., Lindgreen, S., Wilkinson, A. C., Finn, R. D., Griffiths-Jones, S., Eddy, S. R., & Bateman, A. (2009). Rfam: updates to the RNA families database. *Nucleic Acids Research*, *37*(suppl_1), D136–D140. https://doi.org/10.1093/NAR/GKN766

Garone, C., Minczuk, M., Signes, A., & Fernandez-Vizarra, E. (2018). Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I–V and supercomplexes. *Essays in Biochemistry*, *62*(3), 255–270. https://doi.org/10.1042/EBC20170098

Gebregiworgis, T., & Powers, R. (2012). Application of NMR Metabolomics to Search for Human Disease Biomarkers.

Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, *15*(8), 595–610. https://doi.org/10.2174/138620712802650522

Genova, M. L., & Lenaz, G. (2014). Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1837*(4), 427–443. https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2013.11.002

Georgakopoulou, E. A., Tsimaratou, K., Evangelou, K., Fernandez-Marcos, P. J., Zoumpourlis, V., Trougakos, I. P., Kletsas, D., Bartek, J., Serrano, M., & Gorgoulis, V. G. (2012). Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging*, *5*(1), 37–50. https://doi.org/10.18632/AGING.100527

Gertsman, I., & Barshop, B. A. (2018). Promises and pitfalls of untargeted metabolomics. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *41*(3), 355–366. https://doi.org/10.1007/S10545-017-0130-7

Ghemrawi, R., Battaglia-Hsu, S.-F., & Arnold, C. (2018). Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders. *Cells 2018, Vol. 7, Page 63*, *7*(6), 63. https://doi.org/10.3390/CELLS7060063

Ghosh, A. K., & Osswald, H. L. (2014). BACE1 (β-secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Chemical Society Reviews*, *43*(19), 6765–6813. https://doi.org/10.1039/C3CS60460H

Ghosh, R., Wang, L., Wang, E. S., Perera, B. G. K., Igbaria, A., Morita, S., Prado, K., Thamsen, M., Caswell, D., Macias, H., Weiberth, K. F., Gliedt, M. J., Alavi, M. V., Hari, S. B., Mitra, A. K., Bhhatarai, B., Schürer, S. C., Snapp, E. L., Gould, D. B., … Papa, F. R. (2014). Allosteric Inhibition of the IRE1α RNase Preserves Cell Viability and Function during Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell*, *158*(3), 534–548. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.07.002

Giaume, C., & Theis, M. (2010). Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. *Brain Research Reviews*, *63*(1–2), 160–176. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2009.11.005

Giavalisco, P., Köhl, K., Hummel, J., Seiwert, B., & Willmitzer, L. (2009). 13C isotope-labeled metabolomes allowing for improved compound annotation and relative quantification in liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomic research. *Analytical Chemistry*, *81*(15), 6546–6551. https://doi.org/10.1021/AC900979E/SUPPL_FILE/AC900979E_SI_001.PDF

Gil-Bea, F. J., Solas, M., Solomon, A., Mugueta, C., Winblad, B., Kivipelto, M., Ramirez, M. J., & Cedazo-Mínguez, A. (2010). Insulin Levels are Decreased in the Cerebrospinal Fluid of Women with Prodomal Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *22*(2), 405–413. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100795

Gill, A., Gao, N., & Lehrman, M. A. (2002). Rapid activation of glycogen phosphorylase by the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(47), 44747–44753. https://doi.org/10.1074/jbc.M205001200

Gill, H. S., Rutherfurd, K. J., Cross, M. L., & Gopal, P. K. (2001). Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic Bifidobacterium lactis HN019. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *74*(6), 833–839. https://doi.org/10.1093/AJCN/74.6.833

Giovagnoni, C., Ali, M., Eijssen, L. M. T., Maes, R., Choe, K., Mulder, M., Kleinjans, J., del Sol, A., Glaab, E., Mastroeni, D., Delvaux, E., Coleman, P., Losen, M., Pishva, E., Martinez-Martinez, P., & van den Hove, D. L. A. (2021). Altered sphingolipid function in Alzheimer's disease; a gene regulatory network approach. *Neurobiology of Aging*, *102*, 178–187. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2021.02.001

Go, E. P. (2009). Database Resources in Metabolomics: An Overview. *Journal of Neuroimmune Pharmacology 2009 5:1*, *5*(1), 18–30. https://doi.org/10.1007/S11481-009-9157-3

Go, Y. M., Kim, C. W., Walker, D. I., Kang, D. W., Kumar, S., Orr, M., Uppal, K., Quyyumi, A. A., Jo, H., & Jones, D. P. (2015). Disturbed flow induces systemic changes in metabolites in mouse plasma: A metabolomics study using apoe-/- mice with partial carotid ligation. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *308*(1), R62–R72. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00278.2014

Goedert, M. (2018). Tau filaments in neurodegenerative diseases. *FEBS Letters*, *592*(14), 2383–2391. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13108

Goeman, J. J., & Bühlmann, P. (2007). Analyzing gene expression data in terms of gene sets: methodological issues. *Bioinformatics*, *23*(8), 980–987. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTM051

Goetzman, E. S., & Prochownik, E. V. (2018). The role for myc in coordinating glycolysis, oxidative phosphorylation, glutaminolysis, and fatty acid metabolism in normal and neoplastic tissues. *Frontiers in Endocrinology*, *9*(APR), 129. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00129

Goldberg, E. L., & Dixit, V. D. (2015). Drivers of age-related inflammation and strategies for healthspan extension. *Immunological Reviews*, *265*(1), 63–74. https://doi.org/10.1111/IMR.12295

Gomes, C., Cunha, C., Nascimento, F., Ribeiro, J. A., Vaz, A. R., & Brites, D. (2019). Cortical Neurotoxic Astrocytes with Early ALS Pathology and miR-146a Deficit Replicate Gliosis Markers of Symptomatic SOD1G93A Mouse Model. *Molecular Neurobiology*, *56*(3), 2137–2158. https://doi.org/10.1007/S12035-018-1220-8/FIGURES/11

Gomes, C., Sequeira, C., Barbosa, M., Cunha, C., Vaz, A. R., & Brites, D. (2020). *Astrocyte regional diversity in ALS includes distinct aberrant phenotypes with common and causal pathological processes*. *395*(2), 112209. https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2020.112209

Gomes, C., Sequeira, C., Likhite, S., Dennys, C. N., Kolb, S. J., Shaw, P. J., Vaz, A. R., Kaspar, B. K., Meyer, K., & Brites, D. (2022). Neurotoxic Astrocytes Directly Converted from Sporadic and Familial ALS Patient Fibroblasts Reveal Signature Diversities and miR-146a Theragnostic Potential in Specific Subtypes. *Cells*, *11*(7), 1186. https://doi.org/10.3390/CELLS11071186

Gómez, L. A., Heath, S. H. D., & Hagen, T. M. (2012). Acetyl-l-carnitine supplementation reverses the age-related decline in carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) activity in interfibrillar mitochondria without changing the l-carnitine content in the rat heart. *Mechanisms of Ageing and Development*, *133*(2–3), 99–106. https://doi.org/10.1016/J.MAD.2012.01.007

Gonen, N., Meller, A., Sabath, N., & Shalgi, R. (2019). Amino Acid Biosynthesis Regulation during Endoplasmic Reticulum Stress Is Coupled to Protein Expression Demands. *IScience*, *19*, 204–213. https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2019.07.022

Gong, E. J., Park, H. R., Kim, M. E., Piao, S., Lee, E., Jo, D. G., Chung, H. Y., Ha, N. C., Mattson, M. P., & Lee, J. (2011). Morin attenuates tau hyperphosphorylation by inhibiting GSK3β. *Neurobiology of Disease*, *44*(2), 223–230. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2011.07.005

Gong, Y. H., Parsadanian, A. S., Andreeva, A., Snider, W. D., & Elliott, J. L. (2000). Restricted Expression of G86R Cu/Zn Superoxide Dismutase in Astrocytes Results in Astrocytosis But Does Not Cause Motoneuron Degeneration. *The Journal of Neuroscience*, *20*(2), 660. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-02-00660.2000

González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L., & Muñoz-Espín, D. (2021). A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *The FEBS Journal*, *288*(1), 56–80. https://doi.org/10.1111/FEBS.15570

González-Molina, L. A., Villar-Vesga, J., Henao-Restrepo, J., Villegas, A., Lopera, F., Cardona-Gómez, G. P., & Posada-Duque, R. (2021). Extracellular Vesicles From 3xTg-AD Mouse and Alzheimer's Disease Patient Astrocytes Impair Neuroglial and Vascular Components. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*, 37. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2021.593927/BIBTEX

González, I., Cao, K.-A. L., Davis, M. J., & Déjean, S. (2012). Visualising associations between paired 'omics' data sets. *BioData Mining 2012 5:1*, *5*(1), 1–23. https://doi.org/10.1186/1756-0381-5-19

Gostev, M., Faulconbridge, A., Brandizi, M., Fernandez-Banet, J., Sarkans, U., Brazma, A., & Parkinson, H. (2012). The BioSample Database (BioSD) at the European Bioinformatics Institute. *Nucleic Acids Research*, *40*(Database issue). https://doi.org/10.1093/NAR/GKR937

Goyarzu, P., Malin, D. H., Lau, F. C., Taglialatela, G., Moon, W. D., Jennings, R., Moy, E., Moy, D., Lippold, S., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J. A. (2013). Blueberry Supplemented Diet: Effects on Object Recognition Memory and Nuclear Factor-kappa B Levels in Aged Rats. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10284150410001710410*, *7*(2), 75–83. https://doi.org/10.1080/10284150410001710410

Granic, I., Dolga, A. M., Nijholt, I. M., van Dijk, G., & Eisel, U. L. M. (2009). Inflammation and NF-κB in Alzheimer's Disease and Diabetes. *Journal of Alzheimer's Disease*, *16*(4), 809–821. https://doi.org/10.3233/JAD-2009-0976

Green, K. N., Steffan, J. S., Martinez-Coria, H., Sun, X., Schreiber, S. S., Thompson, L. M., & LaFerla, F. M. (2008). Nicotinamide Restores Cognition in Alzheimer's Disease Transgenic Mice via a Mechanism Involving Sirtuin Inhibition and Selective Reduction of Thr231-Phosphotau. *Journal of Neuroscience*, *28*(45), 11500–11510. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3203-08.2008

Green, R. C., Schneider, L. S., Amato, D. A., Beelen, A. P., Wilcock, G., Swabb, E. A., & Zavitz, K. H. (2009). Effect of Tarenflurbil on Cognitive Decline and Activities of Daily Living in Patients With Mild Alzheimer Disease: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, *302*(23), 2557–2564. https://doi.org/10.1001/JAMA.2009.1866

Grehan, S., Tse, E., & Taylor, J. M. (2001). Two Distal Downstream Enhancers Direct Expression of the Human Apolipoprotein E Gene to Astrocytes in the Brain. *Journal of Neuroscience*, *21*(3), 812–822. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-03-00812.2001

Griffin, J. L., Atherton, H., Shockcor, J., & Atzori, L. (2011). Metabolomics as a tool for cardiac research. *Nature Reviews Cardiology 2011 8:11*, *8*(11), 630–643. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.138

Griffin, J. L., & Shockcor, J. P. (2004). Metabolic profiles of cancer cells. *Nature Reviews Cancer 2004 4:7*, *4*(7), 551–561. https://doi.org/10.1038/nrc1390

Griffin, J. W. D., & Bradshaw, P. C. (2017). Amino Acid Catabolism in Alzheimer's Disease Brain: Friend or Foe? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 5472792. https://doi.org/10.1155/2017/5472792

Griffin, W. S.T., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., White, C. L., & Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(19), 7611–7615. https://doi.org/10.1073/PNAS.86.19.7611

Griffin, W. Sue T. (2006). Inflammation and neurodegenerative diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *83*(2), 470S-474S. https://doi.org/10.1093/AJCN/83.2.470S

Gu, L. Z., Huang, B. S., Shen, W., Gao, L., Ding, Z. Z., Wu, H. W., & Guo, J. (2013). Early activation of nSMase2/ceramide pathway in astrocytes is involved in ischemia-associated neuronal damage via inflammation in rat hippocampi. *Journal of Neuroinflammation*, *10*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-109/FIGURES/9

Guiraud, S. P., Montoliu, I., Da Silva, L., Dayon, L., Galindo, A. N., Corthésy, J., Kussmann, M., & Martin, F. P. (2017). High-throughput and simultaneous quantitative analysis of homocysteine–methionine cycle metabolites and co-factors in blood plasma and cerebrospinal fluid by isotope dilution LC–MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*(1), 295–305. https://doi.org/10.1007/S00216-016-0003-1/FIGURES/4

Gupta, A., Bisht, B., & Dey, C. S. (2011). Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes. *Neuropharmacology*, *60*(6), 910–920. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2011.01.033

Guttenplan, K. A., Weigel, M. K., Adler, D. I., Couthouis, J., Liddelow, S. A., Gitler, A. D., & Barres, B. A. (2020). Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease progression in an ALS mouse model. *Nature Communications 2020 11:1*, *11*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17514-9

Guttenplan, K. A., Weigel, M. K., Prakash, P., Wijewardhane, P. R., Hasel, P., Rufen-Blanchette, U., Münch, A. E., Blum, J. A., Fine, J., Neal, M. C., Bruce, K. D., Gitler, A. D., Chopra, G., Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2021). Neurotoxic reactive astrocytes induce cell death via saturated lipids. *Nature 2021 599:7883*, *599*(7883), 102–107. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03960-y

Habib, N., McCabe, C., Medina, S., Varshavsky, M., Kitsberg, D., Dvir-Szternfeld, R., Green, G., Dionne, D., Nguyen, L., Marshall, J. L., Chen, F., Zhang, F., Kaplan, T., Regev, A., & Schwartz, M. (2020). Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. *Nature Neuroscience 2020 23:6*, *23*(6), 701–706. https://doi.org/10.1038/s41593-020-0624-8

Haidet-Phillips, A. M., Hester, M. E., Miranda, C. J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M. J., Foust, K. D., Rao, M., Eagle, A., Kammesheidt, A., Christensen, A., Mendell, J. R., Burghes, A. H. M., & Kaspar, B. K. (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature Biotechnology*, *29*(9), 824–828. https://doi.org/10.1038/NBT.1957

Hajjar, I., Cai, Q., Yu, T., & Jones, D. P. (2020). Untargeted Metabolomics Shows Alterations in Homocysteine, Lipids and

Fatty Acids predicting Memory Decline in Healthy Middle-Aged Individuals. *BioRxiv*, 2020.02.23.949537. https://doi.org/10.1101/2020.02.23.949537

Hajsl, M., Hlavackova, A., Broulikova, K., Sramek, M., Maly, M., Dyr, J. E., & Suttnar, J. (2020). Tryptophan Metabolism, Inflammation, and Oxidative Stress in Patients with Neurovascular Disease. *Metabolites 2020, Vol. 10, Page 208*, *10*(5), 208. https://doi.org/10.3390/METABO10050208

Haley, A. P., Knight-Scott, J., Simnad, V. I., & Manning, C. A. (2006). Increased glucose concentration in the hippocampus in early Alzheimer's disease following oral glucose ingestion. *Magnetic Resonance Imaging*, *24*(6), 715–720. https://doi.org/10.1016/J.MRI.2005.12.020

Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothée, G., Leroy, C., Labit, M., Comley, R. A., De Souza, L. C., Corne, H., Dauphinot, L., Bertoux, M., Dubois, B., Gervais, P., Colliot, O., Potier, M. C., Bottlaender, M., & Sarazin, M. (2016). Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18 F-DPA-714 PET imaging. *Brain*, *139*(4), 1252–1264. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWW017

Hampel, H., Ewers, M., Bürger, K., Annas, P., Mörtberg, A., Bogstedt, A., Frölich, L., Schröder, J., Schönknecht, P., Riepe, M. W., Kraft, I., Gasser, T., Leyhe, T., Möller, H. J., Kurz, A., & Basun, H. (2009). Lithium Trial in Alzheimer's Disease: A Randomized, Single-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter 10-Week Study. *The Journal of Clinical Psychiatry*, *70*(6), 10490. https://doi.org/10.4088/JCP.08M04606

Han, X., Zhang, T., Liu, H., Mi, Y., & Gou, X. (2020). Astrocyte Senescence and Alzheimer's Disease: A Review. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00148

Hannon, G. J. (2010). *FASTX-Toolkit*. http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit.

Hanrahan, J. R., Chebib, M., & Johnston, G. A. R. (2011). Flavonoid modulation of GABAA receptors. *British Journal of Pharmacology*, *163*(2), 234–245. https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2011.01228.X

Haran, J. P., Bhattarai, S. K., Foley, S. E., Dutta, P., Ward, D. V., Bucci, V., & McCormick, B. A. (2019). Alzheimer's disease microbiome is associated with dysregulation of the anti-inflammatory P-glycoprotein pathway. *MBio*, *10*(3). https://doi.org/10.1128/MBIO.00632-19/SUPPL_FILE/MBIO.00632-19-S0001.PDF

Hardy, J. (2009). The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *Journal of Neurochemistry*, *110*(4), 1129–1134. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2009.06181.X

Hart, L. S., Cunningham, J. T., Datta, T., Dey, S., Tameire, F., Lehman, S. L., Qiu, B., Zhang, H., Cerniglia, G., Bi, M., Li, Y., Gao, Y., Liu, H., Li, C., Maity, A., Thomas-Tikhonenko, A., Perl, A. E., Koong, A., Fuchs, S. Y., … Koumenis, C. (2012). ER stress–mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(12), 4621–4634. https://doi.org/10.1172/JCI62973

Hartigan, J. A., & Wong, M. A. (1979). A K-Means Clustering Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, *28*(1), 100–108. https://doi.org/10.2307/2346830

Hartlage-Rübsamen, M., Zeitschel, U., Apelt, J., Gärtner, U., Franke, H., Stahl, T., Günther, A., Schliebs, R., Penkowa, M., Bigl, V., & Roßner, S. (2003). Astrocytic expression of the Alzheimer's disease β-secretase (BACE1) is stimulus-dependent. *Glia*, *41*(2), 169–179. https://doi.org/10.1002/GLIA.10178

Hartmann, K., Sepulveda-Falla, D., Rose, I. V. L., Madore, C., Muth, C., Matschke, J., Butovsky, O., Liddelow, S., Glatzel, M., & Krasemann, S. (2019). Complement 3 +-astrocytes are highly abundant in prion diseases, but their abolishment led to an accelerated disease course and early dysregulation of microglia. *Acta Neuropathologica Communications*, *7*(1), 83. https://doi.org/10.1186/S40478-019-0735-1

Hasel, P., Rose, I. V. L., Sadick, J. S., Kim, R. D., & Liddelow, S. A. (2021). Neuroinflammatory astrocyte subtypes in the mouse brain. *Nature Neuroscience*, *24*(10), 1475–1487. https://doi.org/10.1038/S41593-021-00905-6

Hashimoto, Y., Kaneko, Y., Tsukamoto, E., Frankowski, H., Kouyama, K., Kita, Y., Niikura, T., Aiso, S., Bredesen, D. E., Matsuoka, M., & Nishimoto, I. (2004). Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75NTR/PLAIDD. *Journal of Neurochemistry*, *90*(3), 549–558. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2004.02513.X

Hawkins, R. D., Hon, G. C., & Ren, B. (2010). Next-generation genomics: an integrative approach. *Nature Reviews Genetics*

2010 11:7, *11*(7), 476–486. https://doi.org/10.1038/nrg2795

Hayakawa, K., Pham, L. D. D., Arai, K., & Lo, E. H. (2014). Reactive astrocytes promote adhesive interactions between brain endothelium and endothelial progenitor cells via HMGB1 and beta-2 integrin signaling. *Stem Cell Research*, *12*(2), 531–538. https://doi.org/10.1016/J.SCR.2013.12.008

He, M., Huang, X. F., Gao, G., Zhou, T., Li, W., Hu, J., Chen, J., Li, J., & Sun, T. (2019). Olanzapine-induced endoplasmic reticulum stress and inflammation in the hypothalamus were inhibited by an ER stress inhibitor 4-phenylbutyrate. *Psychoneuroendocrinology*, *104*, 286–299. https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2019.03.017

He, Y., Li, B., Sun, D., & Chen, S. (2020). Gut Microbiota: Implications in Alzheimer's Disease. *Journal of Clinical Medicine 2020, Vol. 9, Page 2042*, *9*(7), 2042. https://doi.org/10.3390/JCM9072042

Hemström, P., & Irgum, K. (2006). Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, *29*(12), 1784–1821. https://doi.org/10.1002/JSSC.200600199

Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., … Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *The Lancet. Neurology*, *14*(4), 388. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5

Heneka, M. T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., Dewachter, I., Walter, J., Klockgether, T., & Van Leuven, F. (2005). Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *Journal of Neuroinflammation*, *2*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-22/FIGURES/5

Henley, D. B., May, P. C., Dean, R. A., & Siemers, E. R. (2009). Development of semagacestat (LY450139), a functional γ-secretase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease. *Http://Dx.Doi.Org/10.1517/14656560903044982*, *10*(10), 1657–1664. https://doi.org/10.1517/14656560903044982

Hernandez-Segura, A., de Jong, T. V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., & Demaria, M. (2017). Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current Biology*, *27*(17), 2652-2660.e4. https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.07.033/ATTACHMENT/724AF0C8-ADEA-4A3D-A892-3552A75E7411/MMC4.XLS

Hernandez, F., Lucas, J. J., & Avila, J. (2013). GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *33 Suppl 1*(SUPPL. 1). https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129025

Herrera, F., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Martín, V., Antolín, I., & Rodriguez, C. (2001). Glutamate induces oxidative stress not mediated by glutamate receptors or cystine transporters: protective effect of melatonin and other antioxidants. *Journal of Pineal Research*, *31*(4), 356–362. https://doi.org/10.1034/J.1600-079X.2001.310411.X

Herrup, K., Neve, R., Ackerman, S. L., & Copani, A. (2004). Divide and Die: Cell Cycle Events as Triggers of Nerve Cell Death. *Journal of Neuroscience*, *24*(42), 9232–9239. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3347-04.2004

Hertz, L., Peng, L., & Dienel, G. A. (2007). Energy metabolism in astrocytes: High rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *27*(2), 219–249. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600343

Hertz, L., & Rothman, D. L. (2017). Glutamine-glutamate cycle flux is similar in cultured astrocytes and brain and both glutamate production and oxidation are mainly catalyzed by aspartate aminotransferase. In *Biology* (Vol. 6, Issue 1). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/biology6010017

Heverin, M., Bogdanovic, N., Lütjohann, D., Bayer, T., Pikuleva, I., Bretillon, L., Diczfalusy, U., Winblad, B., & Björkhem, I. (2004). Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Lipid Research*, *45*(1), 186–193. https://doi.org/10.1194/JLR.M300320-JLR200

Hirst, J. (2018). Open questions: Respiratory chain supercomplexes-why are they there and what do they do? *BMC Biology*, *16*(1), 1–4. https://doi.org/10.1186/S12915-018-0577-5/FIGURES/1

Ho, L., Purohit, D., Haroutunian, V., Luterman, J. D., Willis, F., Naslund, J., Buxbaum, J. D., Mohs, R. C., Aisen, P. S., & Pasinetti, G. M. (2001). Neuronal Cyclooxygenase 2 Expression in the Hippocampal Formation as a Function of the Clinical Progression of Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, *58*(3), 487–492.

https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.58.3.487

Hoffman, J. M., Soltow, Q. A., Li, S., Sidik, A., Jones, D. P., & Promislow, D. E. L. (2014). Effects of age, sex, and genotype on high-sensitivity metabolomic profiles in the fruit fly, Drosophila melanogaster. *Aging Cell*, *13*(4), 596–604. https://doi.org/10.1111/ACEL.12215

Hole, K. L., & Williams, R. J. (2020). Flavonoids as an Intervention for Alzheimer's Disease: Progress and Hurdles Towards Defining a Mechanism of Action. *Brain Plasticity*, *6*(2), 167–192. https://doi.org/10.3233/BPL-200098

Hollinshead, K. E. R., Parker, S. J., Eapen, V. V., Encarnacion-Rosado, J., Sohn, A., Oncu, T., Cammer, M., Mancias, J. D., & Kimmelman, A. C. (2020). Respiratory Supercomplexes Promote Mitochondrial Efficiency and Growth in Severely Hypoxic Pancreatic Cancer. *Cell Reports*, *33*(1), 108231. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.108231

Holmberg Olausson, K., Elsir, T., Moazemi Goudarzi, K., Nistér, M., & Lindström, M. S. (2015). NPM1 histone chaperone is upregulated in glioblastoma to promote cell survival and maintain nucleolar shape. *Scientific Reports 2015 5:1*, *5*(1), 1–15. https://doi.org/10.1038/srep16495

Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., Jones, R. W., Bullock, R., Love, S., Neal, J. W., Zotova, E., & Nicoll, J. A. (2008). Long-term effects of Aβ42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *The Lancet*, *372*(9634), 216–223. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61075-2

Hölscher, C. (2014). The incretin hormones glucagonlike peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide are neuroprotective in mouse models of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *10*(1 SUPPL.), S47–S54. https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2013.12.009

Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K. M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B. A., Lemere, C. A., Selkoe, D. J., & Stevens, B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science (New York, N.Y.)*, *352*(6286), 712–716. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD8373

Hooper, C., Killick, R., & Lovestone, S. (2008). *The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease*. *104*(6), 1433–1439. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x

Horwood, N., & Davies, D. C. (1994). Immunolabelling of hippocampal microvessel glucose transporter protein is reduced in Alzheimer's disease. *Virchows Archiv 1994 425:1*, *425*(1), 69–72. https://doi.org/10.1007/BF00193951

Hotamisligil, G. S. (2010). Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*, *140*(6), 900–917. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.02.034

Houtkooper, R. H., Argmann, C., Houten, S. M., Cantó, C., Jeninga, E. H., Andreux, P. A., Thomas, C., Doenlen, R., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2011). The metabolic footprint of aging in mice. *Scientific Reports 2011 1:1*, *1*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/srep00134

Hove, I. Van, Lemmens, K., Velde, S. Van de, Verslegers, M., & Moons, L. (2012). Matrix metalloproteinase-3 in the central nervous system: a look on the bright side. *Journal of Neurochemistry*, *123*(2), 203–216. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2012.07900.X

Hoyaux, D., Boom, A., Van Den Bosch, L., Belot, N., Martin, J. J., Heizmann, C. W., Kiss, R., & Pochet, R. (2002). S100A6 Overexpression within Astrocytes Associated with Impaired Axons from Both ALS Mouse Model and Human Patients. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *61*(8), 736–744. https://doi.org/10.1093/JNEN/61.8.736

Hrydziuszko, O., & Viant, M. R. (2011). Missing values in mass spectrometry based metabolomics: an undervalued step in the data processing pipeline. *Metabolomics 2011 8:1*, *8*(1), 161–174. https://doi.org/10.1007/S11306-011-0366-4

Hu, W. H., Walters, W. M., Xia, X. M., Karmally, S. A., & Bethea, J. R. (2003). Neuronal glutamate transporter EAAT4 is expressed in astrocytes. *Glia*, *44*(1), 13–25. https://doi.org/10.1002/GLIA.10268

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2008). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols 2009 4:1*, *4*(1), 44–57. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, *37*(1), 1–13. https://doi.org/10.1093/nar/gkn923

Huang, R. P., Fan, Y., Hossain, M. Z., Peng, A., Zeng, Z. L., & Boynton, A. L. (1998). Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Research*, *58*(22), 5089–5096. https://aacrjournals.org/cancerres/article/58/22/5089/504700

Huang, Y., & Mahley, R. W. (2014). Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiology of Disease*, *72*(Part A), 3–12. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2014.08.025

Huber, W., Carey, V. J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B. S., Bravo, H. C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T., Gottardo, R., Hahne, F., Hansen, K. D., Irizarry, R. A., Lawrence, M., Love, M. I., MaCdonald, J., Obenchain, V., Oleš, A. K., … Morgan, M. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods 2015 12:2*, *12*(2), 115–121. https://doi.org/10.1038/nmeth.3252

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, *14*(1), 33–38. https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5

Hunter, S., Jones, P., Mitchell, A., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bateman, A., Bernard, T., Binns, D., Bork, P., Burge, S., De Castro, E., Coggill, P., Corbett, M., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., Finn, R. D., Fraser, M., Gough, J., … Yong, S. Y. (2012). InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Research*, *40*(D1), D306–D312. https://doi.org/10.1093/NAR/GKR948

Hur, J. Y., Welander, H., Behbahani, H., Aoki, M., Frånberg, J., Winblad, B., Frykman, S., & Tjernberg, L. O. (2008). Active γ-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *The FEBS Journal*, *275*(6), 1174–1187. https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2008.06278.X

Hussein, S. S. S., Kamarudin, M. N. A., & Kadir, H. A. (2015). (+)-Catechin Attenuates NF-κB Activation Through Regulation of Akt, MAPK, and AMPK Signaling Pathways in LPS-Induced BV-2 Microglial Cells. *Http://Dx.Doi.Org/10.1142/S0192415X15500548*, *43*(5), 927–952. https://doi.org/10.1142/S0192415X15500548

Hwangbo, D.-S. S., Lee, H.-Y. Y., Abozaid, L. S., & Min, K.-J. J. (2020). Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms. *Nutrients 2020, Vol. 12, Page 1194*, *12*(4), 1194. https://doi.org/10.3390/NU12041194

Hynd, M. R., Scott, H. L., & Dodd, P. R. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, *45*(5), 583–595. https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2004.03.007

Hyun, J. C., Kim, S. K., Seok, M. J., Hwang, E. M., Yong, S. K., Huh, K., & Mook-Jung, I. (2007). IFN-γ-induced BACE1 expression is mediated by activation of JAK2 and ERK1/2 signaling pathways and direct binding of STAT1 to BACE1 promoter in astrocytes. *Glia*, *55*(3), 253–262. https://doi.org/10.1002/GLIA.20451

Hyvärinen, T., Hagman, S., Ristola, M., Sukki, L., Veijula, K., Kreutzer, J., Kallio, P., & Narkilahti, S. (2019). Co-stimulation with IL-1β and TNF-α induces an inflammatory reactive astrocyte phenotype with neurosupportive characteristics in a human pluripotent stem cell model system. *Scientific Reports 2019 9:1*, *9*(1), 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-019-53414-9

Ibarburu, S., Trias, E., Lago, N., Peluffo, H., Barreto-Núñez, R., Varela, V., Beckman, J. S., & Barbeito, L. (2017). Focal Transplantation of Aberrant Glial Cells Carrying the SOD1G93A Mutation into Rat Spinal Cord Induces Extensive Gliosis. *Neuroimmunomodulation*, *24*(3), 143–153. https://doi.org/10.1159/000480639

in 't Veld, B. A., Ruitenberg, A., Hofman, A., Launer, L. J., van Duijn, C. M., Stijnen, T., Breteler, M. M. B., & Stricker, B. H. C. (2001). Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and the Risk of Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, *345*(21), 1515–1521. https://doi.org/10.1056/nejmoa010178

Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K. L., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., Frosch, M. P., Albert, M. S., Hyman, B. T., & Irizarry, M. C. (2004). Early Aβ accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*, *62*(6), 925–931. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000115115.98960.37

Intlekofer, K. A., & Cotman, C. W. (2013). Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *57*, 47–55. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2012.06.011

Iram, T., Trudler, D., Kain, D., Kanner, S., Galron, R., Vassar, R., Barzilai, A., Blinder, P., Fishelson, Z., & Frenkel, D. (2016). Astrocytes from old Alzheimer's disease mice are impaired in Aβ uptake and in neuroprotection. *Neurobiology of Disease*, *96*, 84–94. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.08.001

Ishibashi, M., Egawa, K., & Fukuda, A. (2019). Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 2964*, *20*(12), 2964. https://doi.org/10.3390/IJMS20122964

Ishiwata, T., Teduka, K., Yamamoto, T., Kawahara, K., Matsuda, Y., & Naito, Z. (2011). Neuroepithelial stem cell marker nestin regulates the migration, invasion and growth of human gliomas. *Oncology Reports*, *26*(1), 91–99. https://doi.org/10.3892/OR.2011.1267

Issaq, H. J., Van, Q. N., Waybright, T. J., Muschik, G. M., & Veenstra, T. D. (2009). Analytical and statistical approaches to metabolomics research. *Journal of Separation Science*, *32*(13), 2183–2199. https://doi.org/10.1002/JSSC.200900152

Itagaki, S., McGeer, P. L., Akiyama, H., Zhu, S., & Selkoe, D. (1989). Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *Journal of Neuroimmunology*, *24*(3), 173–182. https://doi.org/10.1016/0165-5728(89)90115-X

Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M., & Sesaki, H. (2013). Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends in Cell Biology*, *23*(2), 64–71. https://doi.org/10.1016/J.TCB.2012.10.006

Ivanisevic, J., Zhu, Z. J., Plate, L., Tautenhahn, R., Chen, S., O'Brien, P. J., Johnson, C. H., Marletta, M. A., Patti, G. J., & Siuzdak, G. (2013). Toward 'Omic scale metabolite profiling: A dual separation-mass spectrometry approach for coverage of lipid and central carbon metabolism. *Analytical Chemistry*, *85*(14), 6876–6884. https://doi.org/10.1021/AC401140H/SUPPL_FILE/AC401140H_SI_001.PDF

Iwata-Ichikawa, E., Kondo, Y., Miyazaki, I., Asanuma, M., & Ogawa, N. (1999). Glial Cells Protect Neurons Against Oxidative Stress via Transcriptional Up-Regulation of the Glutathione Synthesis. *Journal of Neurochemistry*, *72*(6), 2334–2344. https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1999.0722334.X

Iwatsubo, T. (2004). The γ-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Current Opinion in Neurobiology*, *14*(3), 379–383. https://doi.org/10.1016/J.CONB.2004.05.010

Jack, C. R., Knopman, D. S., Weigand, S. D., Wiste, H. J., Vemuri, P., Lowe, V., Kantarci, K., Gunter, J. L., Senjem, M. L., Ivnik, R. J., Roberts, R. O., Rocca, W. A., Boeve, B. F., & Petersen, R. C. (2012). An operational approach to National Institute on Aging–Alzheimer's Association criteria for preclinical Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, *71*(6), 765–775. https://doi.org/10.1002/ANA.22628

Jacob, C. P., Koutsilieri, E., Bartl, J., Neuen-Jacob, E., Arzberger, T., Zander, N., Ravid, R., Roggendorf, W., Riederer, P., & Grünblatt, E. (2007). Alterations in Expression of Glutamatergic Transporters and Receptors in Sporadic Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *11*(1), 97–116. https://doi.org/10.3233/JAD-2007-11113

Jalili-Baleh, L., Babaei, E., Abdpour, S., Nasir Abbas Bukhari, S., Foroumadi, A., Ramazani, A., Sharifzadeh, M., Abdollahi, M., & Khoobi, M. (2018). A review on flavonoid-based scaffolds as multi-target-directed ligands (MTDLs) for Alzheimer's disease. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 152, pp. 570–589). Elsevier Masson. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.004

Jang, S. W., Liu, X., Yepes, M., Shepherd, K. R., Miller, G. W., Liu, Y., Wilson, W. D., Xiao, G., Blanchi, B., Sun, Y. E., & Ye, K. (2010). A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(6), 2687–2692. https://doi.org/10.1073/PNAS.0913572107/SUPPL_FILE/PNAS.200913572SI.PDF

Jansen, I. E., Savage, J. E., Watanabe, K., Bryois, J., Williams, D. M., Steinberg, S., Sealock, J., Karlsson, I. K., Hägg, S., Athanasiu, L., Voyle, N., Proitsi, P., Witoelar, A., Stringer, S., Aarsland, D., Almdahl, I. S., Andersen, F., Bergh, S., Bettella, F., … Posthuma, D. (2019). Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nature Genetics 2019 51:3*, *51*(3), 404–413. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0311-9

Jantzen, P. T., Connor, K. E., DiCarlo, G., Wenk, G. L., Wallace, J. L., Rojiani, A. M., Coppola, D., Morgan, D., & Gordon, M. N. (2002). Microglial Activation and β-Amyloid Deposit Reduction Caused by a Nitric Oxide-Releasing Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug in Amyloid Precursor Protein Plus Presenilin-1 Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience*,

22(6), 2246–2254. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-06-02246.2002

Javonillo, D. I., Tran, K. M., Phan, J., Hingco, E., Kramár, E. A., da Cunha, C., Forner, S., Kawauchi, S., Milinkeviciute, G., Gomez-Arboledas, A., Neumann, J., Banh, C. E., Huynh, M., Matheos, D. P., Rezaie, N., Alcantara, J. A., Mortazavi, A., Wood, M. A., Tenner, A. J., … LaFerla, F. M. (2022). Systematic Phenotyping and Characterization of the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, *15*, 1829. https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.785276/BIBTEX

Ji, X. D., Melman, N., & Jacobson, K. A. (1996). Interactions of Flavonoids and Other Phytochemicals with Adenosine Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, *39*(3), 781–788. https://doi.org/10.1021/JM950661K

Ji, Y. F., Xu, S. M., Zhu, J., Wang, X. X., & Shen, Y. (2011). Insulin increases glutamate transporter GLT1 in cultured astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *405*(4), 691–696. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2011.01.105

Jia, Q., Deng, Y., & Qing, H. (2014). Potential therapeutic strategies for Alzheimer's disease targeting or beyond β -Amyloid: Insights from clinical trials. *BioMed Research International*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/837157

Jiang, H., Gong, T., & Zhou, R. (2020). The strategies of targeting the NLRP3 inflammasome to treat inflammatory diseases. *Advances in Immunology*, *145*, 55–93. https://doi.org/10.1016/BS.AI.2019.11.003

Jiang, M., Li, R., Lyu, J., Li, X., Wang, W., Wang, Z., Sheng, H., Zhang, W., Karhausen, J., & Yang, W. (2020). MCC950, a selective NLPR3 inflammasome inhibitor, improves neurologic function and survival after cardiac arrest and resuscitation. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/S12974-020-01933-Y/FIGURES/5

Jiang, Q., Yin, J., Chen, J., Ma, X., Wu, M., Liu, G., Yao, K., Tan, B., & Yin, Y. (2020). Mitochondria-Targeted Antioxidants: A Step towards Disease Treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*. https://doi.org/10.1155/2020/8837893

Jiao, F., & Gong, Z. (2020). The Beneficial Roles of SIRT1 in Neuroinflammation-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*. https://doi.org/10.1155/2020/6782872

Jimbo, D., Kimura, Y., Taniguchi, M., Inoue, M., & Urakami, K. (2009). Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics*, *9*(4), 173–179. https://doi.org/10.1111/J.1479-8301.2009.00299.X

Jiménez-Riani, M., Díaz-Amarilla, P., Isasi, E., Casanova, G., Barbeito, L., & Olivera-Bravo, S. (2017). Ultrastructural features of aberrant glial cells isolated from the spinal cord of paralytic rats expressing the amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1G93A mutation. *Cell and Tissue Research*, *370*(3), 391–401. https://doi.org/10.1007/S00441-017-2681-1

Jin, S. M., Cho, H. J., Kim, Y. W., Hwang, J. Y., & Mook-Jung, I. (2012). Aβ-induced Ca2+ influx regulates astrocytic BACE1 expression via calcineurin/NFAT4 signals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *425*(3), 649–655. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2012.07.123

Jiwrajka, M., Phillips, A., Butler, M., Rossi, M., & Pocock, J. M. (2016). The Plant-Derived Chalcone 2,2′,5′-Trihydroxychalcone Provides Neuroprotection against Toll-Like Receptor 4 Triggered Inflammation in Microglia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/6301712

Jo, S., Yarishkin, O., Hwang, Y. J., Chun, Y. E., Park, M., Woo, D. H., Bae, J. Y., Kim, T., Lee, J., Chun, H., Park, H. J., Lee, D. Y., Hong, J., Kim, H. Y., Oh, S.-J. J., Park, S. J., Lee, H., Yoon, B.-E. E., Kim, Y., … Lee, C. J. (2014). GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Medicine 2014 20:8*, *20*(8), 886–896. https://doi.org/10.1038/nm.3639

Jochemsen, H. M., Teunissen, C. E., Ashby, E. L., Van Der Flier, W. M., Jones, R. E., Geerlings, M. I., Scheltens, P., Kehoe, P. G., & Muller, M. (2014). The association of angiotensin-converting enzyme with biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, *6*(3), 1–10. https://doi.org/10.1186/ALZRT257/FIGURES/3

Johnson, K. A., Minoshima, S., Bohnen, N. I., Donohoe, K. J., Foster, N. L., Herscovitch, P., Karlawish, J. H., Rowe, C. C., Carrillo, M. C., Hartley, D. M., Hedrick, S., Pappas, V., Thies, W. H., Alzheimer's Association, Society of Nuclear Medicine, & Amyloid Imaging Taskforce. (2013). Appropriate use criteria for amyloid PET: A report of the Amyloid Imaging Task Force, the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, and the Alzheimer's Association. *Alzheimer's & Dementia*, *9*(1), E1–E16. https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2013.01.002

Johnson, S. C. (1967). Hierarchical clustering schemes. *Psychometrika 1967 32:3*, *32*(3), 241–254. https://doi.org/10.1007/BF02289588

Jolliffe, I. (2005). Principal Component Analysis. *Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science*, *3*, 1580–1584. https://doi.org/10.1002/0470013192.BSA501

Jones, V. C., Atkinson-Dell, R., Verkhratsky, A., & Mohamet, L. (2017). Aberrant iPSC-derived human astrocytes in Alzheimer's disease. *Cell Death & Disease 2017 8:3*, *8*(3), e2696–e2696. https://doi.org/10.1038/cddis.2017.89

Jonsson, T., Atwal, J. K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhangale, T., Graham, R. R., Huttenlocher, J., Bjornsdottir, G., Andreassen, O. A., … Stefansson, K. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature 2012 488:7409*, *488*(7409), 96–99. https://doi.org/10.1038/nature11283

Jope, R. S., Mines, M. A., & Beurel, E. (2011). Regulation of cell survival mechanisms in alzheimer's disease by glycogen synthase kinase-3. *International Journal of Alzheimer's Disease*. https://doi.org/10.4061/2011/861072

Joshi-Tope, G., Gillespie, M., Vastrik, I., D'Eustachio, P., Schmidt, E., de Bono, B., Jassal, B., Gopinath, G. R., Wu, G. R., Matthews, L., Lewis, S., Birney, E., & Stein, L. (2005). Reactome: a knowledgebase of biological pathways. *Nucleic Acids Research*, *33*(suppl_1), D428–D432. https://doi.org/10.1093/NAR/GKI072

Joshi, A. U., Minhas, P. S., Liddelow, S. A., Haileselassie, B., Andreasson, K. I., Dorn, G. W., & Mochly-Rosen, D. (2019). Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, *22*(10), 1635–1648. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0486-0

Joshi, A. U., Saw, N. L., Vogel, H., Cunnigham, A. D., Shamloo, M., & Mochly-Rosen, D. (2018). Inhibition of Drp1/Fis1 interaction slows progression of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Molecular Medicine*, *10*(3). https://doi.org/10.15252/EMMM.201708166

Jung, Y. J., Tweedie, D., Scerba, M. T., & Greig, N. H. (2019). Neuroinflammation as a Factor of Neurodegenerative Disease: Thalidomide Analogs as Treatments. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *7*, 313. https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00313/BIBTEX

Jurga, A. M., Paleczna, M., Kadluczka, J., & Kuter, K. Z. (2021). Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules 2021, Vol. 11, Page 1361*, *11*(9), 1361. https://doi.org/10.3390/BIOM11091361

Jurk, D., Wang, C., Miwa, S., Maddick, M., Korolchuk, V., Tsolou, A., Gonos, E. S., Thrasivoulou, C., Jill Saffrey, M., Cameron, K., & von Zglinicki, T. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell*, *11*(6), 996–1004. https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2012.00870.X

Kaddurah-Daouk, R., & Krishnan, K. R. R. (2008). Metabolomics: A Global Biochemical Approach to the Study of Central Nervous System Diseases. *Neuropsychopharmacology 2009 34:1*, *34*(1), 173–186. https://doi.org/10.1038/npp.2008.174

Kajiwara, Y., Wang, E., Wang, M., Sin, W. C., Brennand, K. J., Schadt, E., Naus, C. C., Buxbaum, J., & Zhang, B. (2018). GJA1 (connexin43) is a key regulator of Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathologica Communications 2018 6:1*, *6*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/S40478-018-0642-X

Kalmijn, S., Launer, L. J., Ott, A., Witteman, J. C. M., Hofman, A., & Breteler, M. M. B. (1997). Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Annals of Neurology*, *42*(5), 776–782. https://doi.org/10.1002/ANA.410420514

Kamil, M., Shinsato, Y., Higa, N., Hirano, T., Idogawa, M., Takajo, T., Minami, K., Shimokawa, M., Yamamoto, M., Kawahara, K., Yonezawa, H., Hirano, H., Furukawa, T., Yoshimoto, K., & Arita, K. (2019). High filamin-C expression predicts enhanced invasiveness and poor outcome in glioblastoma multiforme. *British Journal of Cancer 2019 120:8*, *120*(8), 819–826. https://doi.org/10.1038/s41416-019-0413-x

Kamphuis, W., Middeldorp, J., Kooijman, L., Sluijs, J. A., Kooi, E. J., Moeton, M., Freriks, M., Mizee, M. R., & Hol, E. M. (2014). Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *35*(3), 492–510. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2013.09.035

Kandalepas, P. C., & Vassar, R. (2012). Identification and biology of β-secretase. *Journal of Neurochemistry*, *120*(SUPPL. 1),

55–61. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07512.X

Kanehisa, M, & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 27–30. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=102409&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Kanehisa, Minoru, Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D353–D361. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092

Kanehisa, Minoru, Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K. F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M., & Hirakawa, M. (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research*, *34*(Database issue), D354-357. https://doi.org/10.1093/nar/gkj102

Kang, E. B., Koo, J. H., Jang, Y. C., Yang, C. H., Lee, Y., Cosio-Lima, L. M., & Cho, J. Y. (2016). Neuroprotective Effects of Endurance Exercise Against High-Fat Diet-Induced Hippocampal Neuroinflammation. *Journal of Neuroendocrinology*, *28*(5). https://doi.org/10.1111/JNE.12385

Kang, E. Y., Martin, L. J., Mangul, S., Isvilanonda, W., Zou, J., Ben-David, E., Han, B., Lusis, A. J., Shifman, S., & Eskin, E. (2016). Discovering single nucleotide polymorphisms regulating human gene expression using allele specific expression from RNA-seq data. *Genetics*, *204*(3), 1057–1064. https://doi.org/10.1534/GENETICS.115.177246/-/DC1

Kankainen, M., Gopalacharyulu, P., Holm, L., & Orešič, M. (2011). MPEA—metabolite pathway enrichment analysis. *Bioinformatics*, *27*(13), 1878–1879. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR278

Karp, P. D., Ouzounis, C. A., Moore-Kochlacs, C., Goldovsky, L., Kaipa, P., Ahrén, D., Tsoka, S., Darzentas, N., Kunin, V., & López-Bigas, N. (2005). Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes. *Nucleic Acids Research*, *33*(19), 6083–6089. https://doi.org/10.1093/NAR/GKI892

Kartashov, A. V., & Barski, A. (2015). BioWardrobe: an integrated platform for analysis of epigenomics and transcriptomics data. *Genome Biology*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/S13059-015-0720-3

Kasowski, M., Grubert, F., Heffelfinger, C., Hariharan, M., Asabere, A., Waszak, S. M., Habegger, L., Rozowsky, J., Shi, M., Urban, A. E., Hong, M. Y., Karczewski, K. J., Huber, W., Weissman, S. M., Gerstein, M. B., Korbel, J. O., & Snyder, M. (2010). Variation in transcription factor binding among humans. *Science*, *328*(5975), 232–235. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1183621/SUPPL_FILE/KASOWSKI.SOM.PDF

Katajamaa, M., & Orešič, M. (2007). Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Chromatography A*, *1158*(1–2), 318–328. https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2007.04.021

Katavic, P. L., Lamb, K., Navarro, H., & Prisinzano, T. E. (2007). Flavonoids as opioid receptor ligands: Identification and preliminary structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*, *70*(8), 1278–1282. https://doi.org/10.1021/NP070194X/ASSET/IMAGES/NP070194X.SOCIAL.JPEG_V03

Keene, S. D., Greco, T. M., Parastatidis, L., Lee, S. H., Hughes, E. G., Balice-Gordon, R. J., Speicher, D. W., & Ischiropoulos, H. (2009). Mass spectrometric and computational analysis of cytokine-induced alterations in the astrocyte secretome. *PROTEOMICS*, *9*(3), 768–782. https://doi.org/10.1002/PMIC.200800385

Kehrer, J. P. (2010). Lipocalin-2: pro- or anti-apoptotic? *Cell Biology and Toxicology*, *26*(2), 83–89. https://doi.org/10.1007/S10565-009-9119-9

Kell, D. B., Brown, M., Davey, H. M., Dunn, W. B., Spasic, I., & Oliver, S. G. (2005). Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. *Nature Reviews Microbiology 2005 3:7*, *3*(7), 557–565. https://doi.org/10.1038/nrmicro1177

Keller, H. R., Massart, D. L., Liang, Y. Z., & Kvalheim, O. M. (1992). Evolving factor analysis in the presence of heteroscedastic noise. *Analytica Chimica Acta*, *263*(1–2), 29–36. https://doi.org/10.1016/0003-2670(92)85422-3

Kepp, K. P. (2017). Ten Challenges of the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *55*(2), 447–457. https://doi.org/10.3233/JAD-160550

Kesika, P., Suganthy, N., Sivamaruthi, B. S., & Chaiyasut, C. (2021). Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease. *Life Sciences*, *264*, 118627. https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118627

Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits Introduction and historical perspective. *Nature Neuroscience*, *18*(7), 942–952. https://doi.org/10.1038/nn.4043.Diversity

Kielian, T., & Esen, N. (2004). Effects of neuroinflammation on glia–glia gap junctional intercellular communication: a perspective. *Neurochemistry International*, *45*(2–3), 429–436. https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2003.09.010

Kim, D. C., Yoon, C. S., Quang, T. H., Ko, W., Kim, J. S., Oh, H., & Kim, Y. C. (2016). Prenylated Flavonoids from Cudrania tricuspidata Suppress Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammatory Activities in BV2 Microglial Cells. *International Journal of Molecular Sciences 2016, Vol. 17, Page 255*, *17*(2), 255. https://doi.org/10.3390/IJMS17020255

Kim, E. M., & Hwang, O. (2011). Role of matrix metalloproteinase-3 in neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, *116*(1), 22–32. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2010.07082.X

Kim, K. Y., Hwang, S. K., Park, S. Y., Kim, M. J., Jun, D. Y., & Kim, Y. H. (2019). l-Serine protects mouse hippocampal neuronal HT22 cells against oxidative stress-mediated mitochondrial damage and apoptotic cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, *141*, 447–460. https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.07.018

Kim, N. H., Cha, Y. H., Lee, J., Lee, S. H., Yang, J. H., Yun, J. S., Cho, E. S., Zhang, X., Nam, M., Kim, N., Yuk, Y. S., Cha, S. Y., Lee, Y., Ryu, J. K., Park, S., Cheong, J. H., Kang, S. W., Kim, S. Y., Hwang, G. S., … Kim, H. S. (2017). Snail reprograms glucose metabolism by repressing phosphofructokinase PFKP allowing cancer cell survival under metabolic stress. *Nature Communications 2017 8:1*, *8*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/ncomms14374

Kind, T., & Fiehn, O. (2006). Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics*, *7*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-234/FIGURES/5

Kind, T., & Fiehn, O. (2007). Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*, *8*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-105/TABLES/6

Kirkland, J. L., & Tchkonia, T. (2020). Senolytic drugs: from discovery to translation. *Journal of Internal Medicine*, *288*(5), 518–536. https://doi.org/10.1111/JOIM.13141

Kirkland, James L., & Tchkonia, T. (2017). Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*, *21*, 21–28. https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2017.04.013

Kirvell, S. L., Esiri, M., & Francis, P. T. (2006). Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *98*(3), 939–950. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.03935.X

Kitsberg, D., Formstecher, E., Fauquet, M., Kubes, M., Cordier, J., Canton, B., Pan, G. H., Rolli, M., Glowinski, J., & Chneiweiss, H. (1999). Knock-Out of the Neural Death Effector Domain Protein PEA-15 Demonstrates That Its Expression Protects Astrocytes from TNFα-Induced Apoptosis. *Journal of Neuroscience*, *19*(19), 8244–8251. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-19-08244.1999

Klegeris, A. (2021). Targeting neuroprotective functions of astrocytes in neuroimmune diseases. *Https://Doi.Org/10.1080/14728222.2021.1915993*, *25*(4), 237–241. https://doi.org/10.1080/14728222.2021.1915993

Klyubin, I., Walsh, D. M., Lemere, C. A., Cullen, W. K., Shankar, G. M., Betts, V., Spooner, E. T., Jiang, L., Anwyl, R., Selkoe, D. J., & Rowan, M. J. (2005). Amyloid β protein immunotherapy neutralizes Aβ oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nature Medicine 2005 11:5*, *11*(5), 556–561. https://doi.org/10.1038/nm1234

Knopman, D. S., Parisi, J. E., Salviati, A., Floriach-Robert, M., Boeve, B. F., Ivnik, R. J., Smith, G. E., Dickson, D. W., Johnson, K. A., Petersen, L. E., McDonald, W. C., Braak, H., & Petersen, R. C. (2003). Neuropathology of Cognitively Normal Elderly. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *62*(11), 1087–1095. https://doi.org/10.1093/JNEN/62.11.1087

Kobayashi, K., Hayashi, M., Nakano, H., Shimazaki, M., Sugimori, K., & Koshino, Y. (2004). Correlation between astrocyte apoptosis and Alzheimer changes in gray matter lesions in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *6*(6), 623–632. https://doi.org/10.3233/JAD-2004-6606

Koepsell, H., & De, H. (2020). Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology 2020 472:9*, *472*(9), 1299–1343. https://doi.org/10.1007/S00424-020-02441-X

Kögel, D., Concannon, C. G., Müller, T., König, H., Bonner, C., Poeschel, S., Chang, S., Egensperger, R., & Prehn, J. H. M. (2012). The APP intracellular domain (AICD) potentiates ER stress-induced apoptosis. *Neurobiology of Aging*, *33*(9), 2200–2209. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.012

Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X., Esterman, M., Koger, D., Hanson, J., Higgs, R., Liu, F., Malkani, S., Bales, K. R., & Paul, S. M. (2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-β peptides. *Nature Medicine 2004 10:7*, *10*(7), 719–726. https://doi.org/10.1038/nm1058

Kollman, P. A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Lee, T., Duan, Y., Wang, W., Donini, O., Cieplak, P., Srinivasan, J., Case, D. A., & Cheatham, T. E. (2000). Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of Chemical Research*, *33*(12), 889–897. https://doi.org/10.1021/AR000033J

Koronyo-Hamaoui, M., Sheyn, J., Hayden, E. Y., Li, S., Fuchs, D. T., Regis, G. C., Lopes, D. H. J., Black, K. L., Bernstein, K. E., Teplow, D. B., Fuchs, S., Koronyo, Y., & Rentsendorj, A. (2020). Peripherally derived angiotensin converting enzyme-enhanced macrophages alleviate Alzheimer-related disease. *Brain*, *143*(1), 336–358. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWZ364

Kowalik, M. A., Columbano, A., & Perra, A. (2017). Emerging Role of the Pentose Phosphate Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, *7*(MAY). https://doi.org/10.3389/FONC.2017.00087

Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D68–D73. https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1181

Kraft, A. W., Hu, X., Yoon, H., Yan, P., Xiao, Q., Wang, Y., Gil, S. C., Brown, J., Wilhelmsson, U., Restivo, J. L., Cirrito, J. R., Holtzman, D. M., Kim, J., Pekny, M., & Lee, J. M. (2013). Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *The FASEB Journal*, *27*(1), 187–198. https://doi.org/10.1096/FJ.12-208660

Kreimerman, I., Reyes, A. L., Paolino, A., Pardo, T., Porcal, W., Ibarra, M., Oliver, P., Savio, E., & Engler, H. (2019). Biological assessment of a 18f-labeled sulforhodamine 101 in a mouse model of Alzheimer's disease as a potential astrocytosis marker. *Frontiers in Neuroscience*, *13*(JUL), 734. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00734

Kriaučiūnaitė, K., Kaušylė, A., Pajarskienė, J., Tunaitis, V., Lim, D., Verkhratsky, A., & Pivoriūnas, A. (2021). Immortalised Hippocampal Astrocytes from 3xTG-AD Mice Fail to Support BBB Integrity In Vitro: Role of Extracellular Vesicles in Glial-Endothelial Communication. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *41*(3), 551–562. https://doi.org/10.1007/s10571-020-00871-w

Kritsilis, M., Rizou, S. V., Koutsoudaki, P. N., Evangelou, K., Gorgoulis, V. G., & Papadopoulos, D. (2018). Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 10, p. 2937). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. https://doi.org/10.3390/ijms19102937

Kuhl, C., Tautenhahn, R., Böttcher, C., Larson, T. R., & Neumann, S. (2012). CAMERA: An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical Chemistry*, *84*(1), 283–289. https://doi.org/10.1021/AC202450G/SUPPL_FILE/AC202450G_SI_001.PDF

Kuile, B. H., & Westerhoff, H. V. (2001). Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. *FEBS Letters*, *500*(3), 169–171. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02613-8

Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2015*(11), pdb.top084970. https://doi.org/10.1101/PDB.TOP084970

Kulijewicz-Nawrot, M., Syková, E., Chvátal, A., Verkhratsky, A., & Rodríguez, J. J. (2013). Astrocytes and glutamate homoeostasis in Alzheimer's disease: A decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex. *ASN Neuro*, *5*(4), 273–282. https://doi.org/10.1042/AN20130017

Kulijewicz-Nawrot, M., Verkhratsky, A., Chvátal, A., Syková, E., & Rodríguez, J. J. (2012). Astrocytic cytoskeletal atrophy in the medial prefrontal cortex of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Anatomy*, *221*(3), 252–262. https://doi.org/10.1111/J.1469-7580.2012.01536.X

Kumar, A., Das, K., Sharma, D., & Sharma, L. (2021). Drug repurposing strategy for treating Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *17*(S9), e058503. https://doi.org/10.1002/ALZ.058503

Kunkle, B. W., Grenier-Boley, B., Sims, R., Bis, J. C., Damotte, V., Naj, A. C., Boland, A., Vronskaya, M., van der Lee, S. J., Amlie-Wolf, A., Bellenguez, C., Frizatti, A., Chouraki, V., Martin, E. R., Sleegers, K., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Hamilton-Nelson, K. L., Moreno-Grau, S., … Pericak-Vance, M. A. (2019). Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates Aβ, tau, immunity and lipid processing. *Nature Genetics 2019 51:3*, *51*(3), 414–430. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0358-2

Kurochkin, I. V., & Goto, S. (1994). Alzheimer's β-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Letters*, *345*(1), 33–37. https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00387-4

Kurt, M. A., Davies, D. C., & Kidd, M. (1999). β-Amyloid Immunoreactivity in Astrocytes in Alzheimer's Disease Brain Biopsies: An Electron Microscope Study. *Experimental Neurology*, *158*(1), 221–228. https://doi.org/10.1006/EXNR.1999.7096

Kvalheim, O. M., Brakstad, F., & Llang, Y. zeng. (1994). Preprocessing of Analytical Profiles in the Presence of Homoscedastic or Heteroscedastlc Noise. *Analytical Chemistry*, *66*(1), 43–51. https://doi.org/10.1021/ac00073a010

L. Ferreira, I., Resende, R., Ferreiro, E., C. Rego, A., & F. Pereira, C. (2012). Multiple Defects in Energy Metabolism in Alzheimers Disease. *Current Drug Targets*, *11*(10), 1193–1206. https://doi.org/10.2174/1389450111007011193

Lacor, P. N., Buniel, M. C., Furlow, P. W., Clemente, A. S., Velasco, P. T., Wood, M., Viola, K. L., & Klein, W. L. (2007). Aβ Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, *27*(4), 796–807. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3501-06.2007

LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012). Animal Models of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(11), a006320. https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A006320

Laird, F. M., Cai, H., Savonenko, A. V., Farah, M. H., He, K., Melnikova, T., Wen, H., Chiang, H. C., Xu, G., Koliatsos, V. E., Borchelt, D. R., Price, D. L., Lee, H. K., & Wong, P. C. (2005). BACE1, a Major Determinant of Selective Vulnerability of the Brain to Amyloid-β Amyloidogenesis, is Essential for Cognitive, Emotional, and Synaptic Functions. *Journal of Neuroscience*, *25*(50), 11693–11709. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2766-05.2005

Landreth, G., Jiang, Q., Mandrekar, S., & Heneka, M. (2008). PPARγ agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics 2008 5:3*, *5*(3), 481–489. https://doi.org/10.1016/J.NURT.2008.05.003

Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, *9*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559/FIGURES/4

Lanni, C., Racchi, M., Memo, M., Govoni, S., & Uberti, D. (2012). p53 at the crossroads between cancer and neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, *52*(9), 1727–1733. https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2012.02.034

Lapadula, G., Marchesoni, A., Armuzzi, A., Blandizzi, C., Caporali, R., Chimenti, S., Cimaz, R., Cimino, L., Gionchetti, P., Girolomoni, G., Lionetti, P., Marcellusi, A., Mennini, F. S., & Salvarani, C. (2014). Adalimumab in the Treatment of Immune-Mediated Diseases. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *27*, 33–48. https://doi.org/10.1177/03946320140270S103

Larson, J., Lynch, G., Games, D., & Seubert, P. (1999). Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Research*, *840*(1–2), 23–35. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01698-4

Larson, M. E., Sherman, M. A., Greimel, S., Kuskowski, M., Schneider, J. A., Bennett, D. A., & Lesné, S. E. (2012). Soluble α-Synuclein Is a Novel Modulator of Alzheimer's Disease Pathophysiology. *Journal of Neuroscience*, *32*(30), 10253–10266. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0581-12.2012

Lasagna-Reeves, C. A., & Kayed, R. (2011). Astrocytes contain amyloid-β annular protofibrils in Alzheimer's disease brains. *FEBS Letters*, *585*(19), 3052–3057. https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2011.08.027

Laurent, C., Burnouf, S., Ferry, B., Batalha, V. L., Coelho, J. E., Baqi, Y., Malik, E., Mariciniak, E., Parrot, S., Van Der Jeugd, A., Faivre, E., Flaten, V., Ledent, C., D'Hooge, R., Sergeant, N., Hamdane, M., Humez, S., Müller, C. E., Lopes, L. V., … Blum, D. (2014). A2A adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy. *Molecular Psychiatry 2016 21:1*, *21*(1), 97–107. https://doi.org/10.1038/mp.2014.151

Laurent, Cyril, Buée, L., Blum, D., Bu Ee, L., & Blum, D. (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

Law, C. W., Chen, Y., Shi, W., & Smyth, G. K. (2014). Voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology*, *15*(2), 1–17. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24485249/

Le, A., Lane, A. N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., Tsukamoto, T., Rojas, C. J., Slusher, B. S., Zhang, H., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Slebos, R. J. C., Lorkiewicz, P. K., Higashi, R. M., Fan, T. W. M., & Dang, C. V. (2012). Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in b cells. *Cell Metabolism*, *15*(1), 110–121. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2011.12.009/ATTACHMENT/61AE658D-6CF0-47EE-9CFE-3D4A10EF8FFE/MMC1.PDF

Lê Cao, K. A., González, I., & Déjean, S. (2009). integrOmics: an R package to unravel relationships between two omics datasets. *Bioinformatics*, *25*(21), 2855–2856. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP515

Le Prince, G., Delaere, P., Fages, C., Lefrançois, T., Touret, M., Salanon, M., & Tardy, M. (1995). Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurochemical Research 1995 20:7*, *20*(7), 859–862. https://doi.org/10.1007/BF00969698

Leclerc, E., Sturchler, E., & Vetter, S. W. (2010). The S100B/RAGE axis in alzheimer's disease. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*. https://doi.org/10.1155/2010/539581

Lee, B. H., Choi, S. H., Shin, T. J., Pyo, M. K., Hwang, S. H., Kim, B. R., Lee, S. M., Lee, J. H., Kim, H. C., Park, H. Y., Rhim, H., & Nah, S. Y. (2010). Quercetin enhances human α7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated ion current through interactions with Ca2+ binding sites. *Molecules and Cells 2010 30:3*, *30*(3), 245–253. https://doi.org/10.1007/S10059-010-0117-9

Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β-galactosidase is lysosomal β-galactosidase. *Aging Cell*, *5*(2), 187–195. https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2006.00199.X

Lee, J. A., Hall, B., Allsop, J., Alqarni, R., & Allen, S. P. (2021). Lipid metabolism in astrocytic structure and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *112*, 123–136. https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2020.07.017

Lee, Shinrye, Park, J. Y., Lee, W. H., Kim, H., Park, H. C., Mori, K., & Suk, K. (2009). Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrocytosis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(1), 234–249. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5273-08.2009

Lee, Soojung, Yoon, B. E., Berglund, K., Oh, S. J., Park, H., Shin, H. S., Augustine, G. J., & Lee, C. J. (2010). Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science*, *330*(6005), 790–796. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1184334/SUPPL_FILE/LEE.SOM.PDF

Lee, Soyoung, & Schmitt, C. A. (2019). The dynamic nature of senescence in cancer. *Nature Cell Biology 2019 21:1*, *21*(1), 94–101. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2

Leek, J. T., Scharpf, R. B., Bravo, H. C., Simcha, D., Langmead, B., Johnson, W. E., Geman, D., Baggerly, K., & Irizarry, R. A. (2010). Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nature Reviews Genetics 2010 11:10*, *11*(10), 733–739. https://doi.org/10.1038/nrg2825

Levin, J. Z., Yassour, M., Adiconis, X., Nusbaum, C., Thompson, D. A., Friedman, N., Gnirke, A., & Regev, A. (2010). Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. *Nature Methods 2010 7:9*, *7*(9), 709–715. https://doi.org/10.1038/nmeth.1491

Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, *12*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323/TABLES/6

Li, C., & Götz, J. (2017). Tau-based therapies in neurodegeneration: opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug*

Discovery 2017 16:12, *16*(12), 863–883. https://doi.org/10.1038/nrd.2017.155

Li, J. T., & Zhang, Y. (2018). TREM2 regulates innate immunity in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/S12974-018-1148-Y/FIGURES/3

Li, J., Yu, L., Gu, X., Ma, Y., Pasqualini, R., Arap, W., Snyder, E. Y., & Sidman, R. L. (2013). Tissue plasminogen activator regulates Purkinje neuron development and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(26), E2410–E2419. https://doi.org/10.1073/PNAS.1305010110/-/DCSUPPLEMENTAL

Li, Lizhen, Lundkvist, A., Andersson, D., Wilhelmsson, U., Nagai, N., Pardo, A. C., Nodin, C., Ståhlberg, A., Aprico, K., Larsson, K., Yabe, T., Moons, L., Fotheringham, A., Davies, I., Carmeliet, P., Schwartz, J. P., Pekna, M., Kubista, M., Blomstrand, F., … Pekny, M. (2008). Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *28*(3), 468–481. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600546

Li, Lun, Acioglu, C., Heary, R. F., & Elkabes, S. (2021). Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases. *Brain, Behavior, and Immunity*, *91*, 740–755. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2020.10.007

Li, M., Wang, I. X., Li, Y., Bruzel, A., Richards, A. L., Toung, J. M., & Cheung, V. G. (2011). Widespread RNA and DNA sequence differences in the human transcriptome. *Science*, *333*(6038), 53–58. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1207018/SUPPL_FILE/LI.SOM.REV.PDF

Li, Shuzhao, Park, Y., Duraisingham, S., Strobel, F. H., Khan, N., Soltow, Q. A., Jones, D. P., & Pulendran, B. (2013). Predicting Network Activity from High Throughput Metabolomics. *PLoS Computational Biology*, *9*(7), 1003123. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003123

Li, Shuzhao, Todor, A., & Luo, R. (2016). Blood transcriptomics and metabolomics for personalized medicine. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *14*, 1–7. https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2015.10.005

Li, Suyan, Uno, Y., Rudolph, U., Cobb, J., Liu, J., Anderson, T., Levy, D., Balu, D. T., & Coyle, J. T. (2018). Astrocytes in primary cultures express serine racemase, synthesize d-serine and acquire A1 reactive astrocyte features. *Biochemical Pharmacology*, *151*, 245–251. https://doi.org/10.1016/J.BCP.2017.12.023

Li, T., Chen, X., Zhang, C., Zhang, Y., & Yao, W. (2019). An update on reactive astrocytes in chronic pain. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/S12974-019-1524-2/FIGURES/7

Li, W. P., Chan, W. Y., Lai, H. W. L., & Yew, D. T. (1997). Terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) positive cells in the different regions of the brain in normal aging and alzheimer patients. *Journal of Molecular Neuroscience 1997 8:2*, *8*(2), 75–82. https://doi.org/10.1007/BF02736774

Li, Y., Sun, H., Chen, Z., Xu, H., Bu, G., & Zheng, H. (2016). Implications of GABAergic neurotransmission in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *8*(FEB), 31. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2016.00031/BIBTEX

Lian, H., Litvinchuk, A., Chiang, A. C. A., Aithmitti, N., Jankowsky, J. L., & Zheng, H. (2016). Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *36*(2), 577–589. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016

Lian, H., Yang, L., Cole, A., Sun, L., Chiang, A. C. A., Fowler, S. W., Shim, D. J., Rodriguez-Rivera, J., Taglialatela, G., Jankowsky, J. L., Lu, H. C., Zheng, H., H, L., L, Y., A, C., L, S., AC, C., SW, F., DJ, S., … H, Z. (2015). NFκB-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron*, *85*(1), 101–115. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2014.11.018

Liang, W. S., Reiman, E. M., Valla, J., Dunckley, T., Beach, T. G., Grover, A., Niedzielko, T. L., Schneider, L. E., Mastroeni, D., Caselli, R., Kukull, W., Morris, J. C., Hulette, C. M., Schmechel, D., Rogers, J., & Stephan, D. A. (2008). Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(11), 4441–4446. https://doi.org/10.1073/PNAS.0709259105

Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, *30*(7), 923–930. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656

Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2019). The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and

quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research*, *47*(8). https://doi.org/10.1093/nar/gkz114

Lichtblau, Y., Zimmermann, K., Haldemann, B., Lenze, D., Hummel, M., & Leser, U. (2017). Comparative assessment of differential network analysis methods. *Briefings in Bioinformatics*, *18*(5), 837–850. https://doi.org/10.1093/BIB/BBW061

Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. In *Immunity* (Vol. 46, Issue 6, pp. 957–967). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006

Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W.-S. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., … Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481–487. https://doi.org/10.1038/nature21029

Liddelow, S. A., & Sofroniew, M. V. (2019). Astrocytes usurp neurons as a disease focus. *Nature Neuroscience 2019 22:4*, *22*(4), 512–513. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0367-6

Lim, E., Pon, A., Djoumbou, Y., Knox, C., Shrivastava, S., Guo, A. C., Neveu, V., & Wishart, D. S. (2010). T3DB: a comprehensively annotated database of common toxins and their targets. *Nucleic Acids Research*, *38*(Database issue), D781-6. https://doi.org/10.1093/nar/gkp934

Lin, C. T., Lecca, D., Yang, L. Y., Luo, W., Scerba, M. T., Tweedie, D., Huang, P. Sen, Jung, Y. J., Kim, D. S., Yang, C. H., Hoffer, B. J., Wang, J. Y., & Greig, N. H. (2020). 3,6′-dithiopomalidomide reduces neural loss, inflammation, behavioral deficits in brain injury and microglial activation. *ELife*, *9*, 1–78. https://doi.org/10.7554/ELIFE.54726

Linnerbauer, M., & Rothhammer, V. (2020). Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. *Frontiers in Immunology*, *11*, 2571. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.573256/BIBTEX

Liquet, B., Cao, K. A. L., Hocini, H., & Thiébaut, R. (2012). A novel approach for biomarker selection and the integration of repeated measures experiments from two assays. *BMC Bioinformatics*, *13*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-325/FIGURES/5

Liu, H., & Hou, T. (2016). CaFE: a tool for binding affinity prediction using end-point free energy methods. *Bioinformatics*, *32*(14), 2216–2218. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW215

Liu, J., Xia, X., & Huang, P. (2020). xCT: A Critical Molecule That Links Cancer Metabolism to Redox Signaling. *Molecular Therapy*, *28*(11), 2358. https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2020.08.021

Liu, K. H., Nellis, M., Uppal, K., Ma, C., Tran, V. L., Liang, Y., Walker, D. I., & Jones, D. P. (2020). Reference Standardization for Quantification and Harmonization of Large-Scale Metabolomics. *Analytical Chemistry*, *92*(13), 8836–8844. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00338

Liu, K. T., Yeh, I. J., Chou, S. K., Yen, M. C., & Kuo, P. L. (2018). Regulatory mechanism of fatty acid-CoA metabolic enzymes under endoplasmic reticulum stress in lung cancer. *Oncology Reports*, *40*(5), 2674–2682. https://doi.org/10.3892/OR.2018.6664/HTML

Liu, L., & Chan, C. (2014). IPAF inflammasome is involved in interleukin-1β production from astrocytes, induced by palmitate; implications for Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, *35*(2), 309–321. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2013.08.016

Liu, L., Martin, R., & Chan, C. (2013). Palmitate-activated astrocytes via serine palmitoyltransferase increase BACE1 in primary neurons by sphingomyelinases. *Neurobiology of Aging*, *34*(2), 540–550. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2012.05.017

Liu, L., Martin, R., Kohler, G., & Chan, C. (2013). Palmitate induces transcriptional regulation of BACE1 and presenilin by STAT3 in neurons mediated by astrocytes. *Experimental Neurology*, *248*, 482–490. https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2013.08.004

Liu, M., Kay, J. C., Shen, S., & Qiao, L. Y. (2015). Endogenous BDNF augments NMDA receptor phosphorylation in the spinal cord via PLCγ, PKC, and PI3K/Akt pathways during colitis. *Journal of Neuroinflammation*, *12*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/S12974-015-0371-Z/FIGURES/7

Liu, S., Gao, J., Zhu, M., Liu, K., & Zhang, H. L. (2020). Gut Microbiota and Dysbiosis in Alzheimer's Disease: Implications for Pathogenesis and Treatment. *Molecular Neurobiology 2020 57:12*, *57*(12), 5026–5043. https://doi.org/10.1007/S12035-020-02073-3

Lo, C. C., & Chain, P. S. G. (2014). Rapid evaluation and quality control of next generation sequencing data with FaQCs. *BMC Bioinformatics*, *15*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/S12859-014-0366-2/TABLES/3

Lobo-Jarne, T., Pérez-Pérez, R., Fontanesi, F., Timón-Gómez, A., Wittig, I., Peñas, A., Serrano-Lorenzo, P., García-Consuegra, I., Arenas, J., Martín, M. A., Barrientos, A., & Ugalde, C. (2020). Multiple pathways coordinate assembly of human mitochondrial complex IV and stabilization of respiratory supercomplexes. *The EMBO Journal*, *39*(14), e103912. https://doi.org/10.15252/EMBJ.2019103912

Lobsiger, C. S., Boillée, S., & Cleveland, D. W. (2007). Toxicity from different SOD1 mutants dysregulates the complement system and the neuronal regenerative response in ALS motor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(18), 7319–7326. https://doi.org/10.1073/PNAS.0702230104/SUPPL_FILE/02230TABLE6.PDF

Lodeiro, M., Ibáñez, C., Cifuentes, A., Simó, C., & Cedazo-Mínguez, Á. (2014). Decreased Cerebrospinal Fluid Levels of L-Carnitine in Non-Apolipoprotein E4 Carriers at Early Stages of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *41*(1), 223–232. https://doi.org/10.3233/JAD-132063

Lopes-Paciencia, S., Saint-Germain, E., Rowell, M. C., Ruiz, A. F., Kalegari, P., & Ferbeyre, G. (2019). The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*, *117*, 15–22. https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2019.01.013

Lõpez-Hernández, B., Ceña, V., & Posadas, I. (2015). The endoplasmic reticulum stress and the HIF-1 signalling pathways are involved in the neuronal damage caused by chemical hypoxia. *British Journal of Pharmacology*, *172*(11), 2838–2851. https://doi.org/10.1111/BPH.13095

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, *153*(6), 1194–1217. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.039

Love, M. I., Anders, S., Kim, V., & Huber, W. (2015). RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. *F1000Research*, *4*, 1070. https://doi.org/10.12688/f1000research.7035.1

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 1–21. https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8/FIGURES/9

Lovén, J., Orlando, D. A., Sigova, A. A., Lin, C. Y., Rahl, P. B., Burge, C. B., Levens, D. L., Lee, T. I., & Young, R. A. (2012). Revisiting global gene expression analysis. *Cell*, *151*(3), 476–482. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.10.012/ATTACHMENT/37C4A863-F08F-4CB1-ACBB-641D8E2B3068/MMC3.XLS

Löwe, L. C., Gaser, C., & Franke, K. (2016). The Effect of the APOE Genotype on Individual BrainAGE in Normal Aging, Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease. *PLOS ONE*, *11*(7), e0157514. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0157514

Luchsinger, J. A., Tang, M. X., Shea, S., & Mayeux, R. (2002). Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, *59*(8), 1258–1263. https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.59.8.1258

Lucke-Wold, B. P., Turner, R. C., Logsdon, A. F., Simpkins, J. W., Alkon, D. L., Smith, K. E., Chen, Y. W., Tan, Z., Huber, J. D., & Rosen, C. L. (2015). Common Mechanisms of Alzheimer's Disease and Ischemic Stroke: The Role of Protein Kinase C in the Progression of Age-Related Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, *43*(3), 711–724. https://doi.org/10.3233/JAD-141422

Lue, L. F., Brachova, L., Civin, W. H., & Rogers, J. (1996). Inflammation, Aβ Deposition, and Neurofibrillary Tangle Formation as Correlates of Alzheimer's Disease Neurodegeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *55*(10), 1083–1088. https://doi.org/10.1097/00005072-199655100-00008

Lue, L. F., Walker, D. G., Brachova, L., Beach, T. G., Rogers, J., Schmidt, A. M., Stern, D. M., & Yan, S. Du. (2001). Involvement of Microglial Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) in Alzheimer's Disease: Identification of a Cellular Activation Mechanism. *Experimental Neurology*, *171*(1), 29–45. https://doi.org/10.1006/EXNR.2001.7732

Luo, W., & Brouwer, C. (2013). Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics*, *29*(14), 1830–1831. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt285

Luo, W., Friedman, M. S., Shedden, K., Hankenson, K. D., & Woolf, P. J. (2009). GAGE: Generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC Bioinformatics*, *10*. https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-161

Luterman, J. D., Haroutunian, V., Yemul, S., Ho, L., Purohit, D., Aisen, P. S., Mohs, R., & Pasinetti, G. M. (2000). Cytokine Gene Expression as a Function of the Clinical Progression of Alzheimer Disease Dementia. *Archives of Neurology*, *57*(8), 1153–1160. https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.57.8.1153

Lyketsos, C. G., Breitner, J. C. S., Green, R. C., Martin, B. K., Meinert, C., Piantadosi, S., & Sabbagh, M. (2007). Naproxen and celecoxib do not prevent AD in early results from a randomized controlled trial. *Neurology*, *68*(21), 1800–1808. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000260269.93245.D2

Lynch, C., & Alzheimer's Disease International. (2019). World Alzheimer Report 2019. *Alzheimer's and Dementia*, *16*(S10), e038255. https://doi.org/10.1002/alz.038255

Ma, H., Sorokin, A., Mazein, A., Selkov, A., Selkov, E., Demin, O., & Goryanin, I. (2007). The Edinburgh human metabolic network reconstruction and its functional analysis. *Molecular Systems Biology*, *3*(1), 135. https://doi.org/10.1038/MSB4100177

Ma, K., Mount, H. T. J., & McLaurin, J. A. (2011). Region-specific distribution of β-amyloid peptide and cytokine expression in TgCRND8 mice. *Neuroscience Letters*, *492*(1), 5–10. https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2011.01.035

MacPherson, K. P., Sompol, P., Kannarkat, G. T., Chang, J., Sniffen, L., Wildner, M. E., Norris, C. M., & Tansey, M. G. (2017). Peripheral administration of the soluble TNF inhibitor XPro1595 modifies brain immune cell profiles, decreases beta-amyloid plaque load, and rescues impaired long-term potentiation in 5xFAD mice. *Neurobiology of Disease*, *102*, 81–95. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2017.02.010

Magistretti, P. J. (2006). Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 209, Issue 12, pp. 2304–2311). The Company of Biologists Ltd. https://doi.org/10.1242/jeb.02208

Mahase, E. (2021a). FDA approves controversial Alzheimer's drug despite uncertainty over effectiveness. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *373*. https://doi.org/10.1136/BMJ.N1462

Mahase, E. (2021b). Three FDA advisory panel members resign over approval of Alzheimer's drug. *BMJ*, *373*, n1503. https://doi.org/10.1136/BMJ.N1503

Mahase, E. (2021c). Aducanumab: European agency rejects Alzheimer's drug over efficacy and safety concerns. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *375*, n3127. https://doi.org/10.1136/BMJ.N3127

Malcangio, M., & Lessmann, V. (2003). A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, *24*(3), 116–121. https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00025-7

Man, A. W. C., Zhou, Y., Xia, N., & Li, H. (2020). Involvement of Gut Microbiota, Microbial Metabolites and Interaction with Polyphenol in Host Immunometabolism. *Nutrients 2020, Vol. 12, Page 3054*, *12*(10), 3054. https://doi.org/10.3390/NU12103054

Mandrekar-Colucci, S., Colleen Karlo, J., & Landreth, G. E. (2012). Mechanisms Underlying the Rapid Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ-Mediated Amyloid Clearance and Reversal of Cognitive Deficits in a Murine Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, *32*(30), 10117–10128. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5268-11.2012

Manjang, K., Tripathi, S., Yli-Harja, O., Dehmer, M., & Emmert-Streib, F. (2020). Graph-based exploitation of gene ontology using GOxploreR for scrutinizing biological significance. *Scientific Reports*, *10*(1), 16672. https://doi.org/10.1038/s41598-020-73326-3

Manley, G. T., Zador, Z., Stiver, S., & Wang, V. (2009). Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *190*(190), 159–170. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_7

Manzine, P. R., Ettcheto, M., Cano, A., Busquets, O., Marcello, E., Pelucchi, S., Di Luca, M., Endres, K., Olloquequi, J., Camins,

A., & Cominetti, M. R. (2019). ADAM10 in Alzheimer's disease: Pharmacological modulation by natural compounds and its role as a peripheral marker. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *113*, 108661. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.108661

Manzoni, C., Kia, D. A., Vandrovcova, J., Hardy, J., Wood, N. W., Lewis, P. A., & Ferrari, R. (2018). Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Briefings in Bioinformatics*, *19*(2), 286. https://doi.org/10.1093/BIB/BBW114

Manzoor, S., & Hoda, N. (2020). A comprehensive review of monoamine oxidase inhibitors as Anti-Alzheimer's disease agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *206*, 112787. https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112787

Marchal, J., Pifferi, F., & Aujard, F. (2013). Resveratrol in mammals: effects on aging biomarkers, age-related diseases, and life span. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1290*(1), 67–73. https://doi.org/10.1111/NYAS.12214

Marchetti, L., Bonsignore, F., Gobbo, F., Amodeo, R., Calvello, M., Jacob, A., Signore, G., Spagnolo, C. S., Porciani, D., Mainardi, M., Beltram, F., Luin, S., & Cattaneo, A. (2019). Fast-diffusing p75NTR monomers support apoptosis and growth cone collapse by neurotrophin ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(43), 21563–21572. https://doi.org/10.1073/PNAS.1902790116/VIDEO-5

Marchetto, M. C. N., Muotri, A. R., Mu, Y., Smith, A. M., Cezar, G. G., & Gage, F. H. (2008). Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, *3*(6), 649–657. https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.10.001

Marlatt, M. W., Bauer, J., Aronica, E., Van Haastert, E. S., Hoozemans, J. J. M., Joels, M., & Lucassen, P. J. (2014). Proliferation in the alzheimer hippocampus is due to microglia, not astroglia, and occurs at sites of amyloid deposition. *Neural Plasticity*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/693851

Marshak, D. R., Pesce, S. A., Stanley, L. C., & Griffin, W. S. T. (1992). Increased S100β neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiology of Aging*, *13*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/0197-4580(92)90002-F

Martin-Jiménez, C. A., García-Vega, Á., Cabezas, R., Aliev, G., Echeverria, V., González, J., & Barreto, G. E. (2017). Astrocytes and endoplasmic reticulum stress: A bridge between obesity and neurodegenerative diseases. *Progress in Neurobiology*, *158*, 45–68. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2017.08.001

Martin, B. K., Szekely, C., Brandt, J., Piantadosi, S., Breitner, J. C. S., Craft, S., Evans, D., Green, R., & Mullan, M. (2008). Cognitive Function Over Time in the Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT): Results of a Randomized, Controlled Trial of Naproxen and Celecoxib. *Archives of Neurology*, *65*(7), 896–905. https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.2008.65.7.NCT70006

Martínez-Busi, M., Arredondo, F., González, D., Echeverry, C., Vega-Teijido, M. A., Carvalho, D., Rodríguez-Haralambides, A., Rivera, F., Dajas, F., & Abin-Carriquiry, J. A. (2019). Purification, structural elucidation, antioxidant capacity and neuroprotective potential of the main polyphenolic compounds contained in Achyrocline satureioides (Lam) D.C. (Compositae). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *27*(12). https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.047

Martínez-Palma, L., Miquel, E., Lagos-Rodríguez, V., Barbeito, L., Cassina, A., & Cassina, P. (2019). Mitochondrial Modulation by Dichloroacetate Reduces Toxicity of Aberrant Glial Cells and Gliosis in the SOD1G93A Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*, *16*(1), 203–215. https://doi.org/10.1007/S13311-018-0659-7/FIGURES/5

Marton, R. M., Miura, Y., Sloan, S. A., Li, Q., Revah, O., Levy, R. J., Huguenard, J. R., & Pașca, S. P. (2019). Differentiation and maturation of oligodendrocytes in human three-dimensional neural cultures. *Nature Neuroscience 2019 22:3*, *22*(3), 484–491. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0316-9

Masliah, A., Terry, R. D., Alford, M., DeTeresa, R., & Hansen, L. A. (1991). Cortical and subcortical patterns of synaptophysinlike immunoreactivity in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, *138*(1), 235. /pmc/articles/PMC1886043/?report=abstract

Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L. A., McKeel, D. W., & Morris, J. C. (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*, *56*(1), 127–129. https://doi.org/10.1212/WNL.56.1.127

Masliah, Eliezer, Achim, C. L., Ge, N., DeTeresa, R., Terry, R. D., & Wiley, C. A. (1992). Spectrum of human immunodeficiency virus–associated neocortical damage. *Annals of Neurology*, *32*(3), 321–329. https://doi.org/10.1002/ANA.410320304

Massa, M. S., Chiogna, M., & Romualdi, C. (2010). Gene set analysis exploiting the topology of a pathway. *BMC Systems Biology*, *4*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-121/TABLES/4

Matos, M., Augusto, E., Oliveira, C. R., & Agostinho, P. (2008). Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: Involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience*, *156*(4), 898–910. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.08.022

Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., Yarasheski, K. E., & Bateman, R. J. (2010). Decreased clearance of CNS β-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, *330*(6012), 1774. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1197623/SUPPL_FILE/MAWUENYEGA.SOM.PDF

McAlpine, F. E., Lee, J. K., Harms, A. S., Ruhn, K. A., Blurton-Jones, M., Hong, J., Das, P., Golde, T. E., LaFerla, F. M., Oddo, S., Blesch, A., & Tansey, M. G. (2009). Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology. *Neurobiology of Disease*, *34*(1), 163–177. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2009.01.006

McClean, P. L., & Hölscher, C. (2014). Lixisenatide, a drug developed to treat type 2 diabetes, shows neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, *86*, 241–258. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2014.07.015

Mcclean, P. L., Parthsarathy, V., Faivre, E., & Holscher, C. (2011). The Diabetes Drug Liraglutide Prevents Degenerative Processes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, *31*(17), 6587–6594. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0529-11.2011

McDermott, J. R., & Gibson, A. M. (1997). Degradation of Alzheimer's ß-Amyloid Protein by Human and Rat Brain Peptidases: Involvement of Insulin-Degrading Enzyme. *Neurochemical Research 1997 22:1*, *22*(1), 49–56. https://doi.org/10.1023/A:1027325304203

McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology*, *217*(1), 65–77. https://doi.org/10.1083/JCB.201708092

McKee, A. C., Carreras, I., Hossain, L., Ryu, H., Klein, W. L., Oddo, S., LaFerla, F. M., Jenkins, B. G., Kowall, N. W., & Dedeoglu, A. (2008). Ibuprofen reduces Aβ, hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice. *Brain Research*, *1207*, 225–236. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.01.095

Medina, I., Carbonell, J., Pulido, L., Madeira, S. C., Goetz, S., Conesa, A., Tárraga, J., Pascual-Montano, A., Nogales-Cadenas, R., Santoyo, J., García, F., Marbà, M., Montaner, D., & Dopazo, J. (2010). Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Research*, *38*(suppl_2), W210–W213. https://doi.org/10.1093/NAR/GKQ388

Medina, M. (2018). An Overview on the Clinical Development of Tau-Based Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences 2018, Vol. 19, Page 1160*, *19*(4), 1160. https://doi.org/10.3390/IJMS19041160

Medina, M., & Avila, J. (2013). New insights into the role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease. *Https://Doi.Org/10.1517/14728222.2013.843670*, *18*(1), 69–77. https://doi.org/10.1517/14728222.2013.843670

Meeker, K. D., Meabon, J. S., & Cook, D. G. (2015). Partial Loss of the Glutamate Transporter GLT-1 Alters Brain Akt and Insulin Signaling in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *45*(2), 509–520. https://doi.org/10.3233/JAD-142304

Meier, J. J. (2012). GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews. Endocrinology*, *8*(12), 728–742. https://doi.org/10.1038/NRENDO.2012.140

Meng, C., Zeleznik, O. A., Thallinger, G. G., Kuster, B., Gholami, A. M., & Culhane, A. C. (2016). Dimension reduction techniques for the integrative analysis of multi-omics data. *Briefings in Bioinformatics*, *17*(4), 628–641. https://doi.org/10.1093/BIB/BBV108

Mercado, G., Castillo, V., Soto, P., López, N., Axten, J. M., Sardi, S. P., Hoozemans, J. J. M., & Hetz, C. (2018). Targeting PERK

signaling with the small molecule GSK2606414 prevents neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, *112*, 136–148. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2018.01.004

Mhatre, S. D., Tsai, C. A., Rubin, A. J., James, M. L., & Andreasson, K. I. (2015). Microglial Malfunction: The Third Rail in the Development of Alzheimer's Disease. *Trends in Neurosciences*, *38*(10), 621–636. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2015.08.006

Millan, M. J. (2006). Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacology & Therapeutics*, *110*(2), 135–370. https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2005.11.006

Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D., & Sedoris, K. (2012). c-Myc and Cancer Metabolism. *Clinical Cancer Research*, *18*(20), 5546–5553. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977

Miller, J. R., Koren, S., & Sutton, G. (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*, *95*(6), 315–327. https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2010.03.001

Minhas, R., Bansal, Y., & Bansal, G. (2020). Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update. *Medicinal Research Reviews*, *40*(3), 823–855. https://doi.org/10.1002/MED.21636

Mitew, S., Kirkcaldie, M. T. K., Dickson, T. C., & Vickers, J. C. (2013). Altered synapses and gliotransmission in Alzheimer's disease and AD model mice. *Neurobiology of Aging*, *34*(10), 2341–2351. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2013.04.010

Mizukami, K., Ikonomovic, M. D., Grayson, D. R., Sheffield, R., & Armstrong, D. M. (1998). Immunohistochemical study of GABAA receptor α1 subunit in the hippocampal formation of aged brains with Alzheimer-related neuropathologic changes. *Brain Research*, *799*(1), 148–155. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00437-5

Mohamed, R. A., Agha, A. M., Abdel-Rahman, A. A., & Nassar, N. N. (2016). Role of adenosine A2A receptor in cerebral ischemia reperfusion injury: Signaling to phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase (pERK1/2). *Neuroscience*, *314*, 145–159. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.11.059

Molofsky, A. V., Krenick, R., Ullian, E., Tsai, H., Deneen, B., Richardson, W. D., Barres, B. A., & Rowitch, D. H. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & Development*, *26*(9), 891–907. https://doi.org/10.1101/GAD.188326.112

Moloney, A. M., Griffin, R. J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., & O'Neill, C. (2010). Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiology of Aging*, *31*(2), 224–243. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2008.04.002

Monterey, M. D., Wei, H., Wu, X., & Wu, J. Q. (2021). The Many Faces of Astrocytes in Alzheimer's Disease. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 12, p. 1402). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fneur.2021.619626

Moreno-Blas, D., Gorostieta-Salas, E., Pommer-Alba, A., Muciño-Hernández, G., Gerónimo-Olvera, C., Maciel-Barón, L. A., Konigsberg, M., Massieu, L., & Castro-Obregón, S. (2019). Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy. *Aging*, *11*(16), 6175–6198. https://doi.org/10.18632/AGING.102181

Morris, G. P., Clark, I. A., & Vissel, B. (2014). Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathologica Communications*, *2*(1), 1–21. https://doi.org/10.1186/S40478-014-0135-5/FIGURES/3

Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., & Wilson, R. S. (2004). Dietary fat intake and 6-year cognitive change in an older biracial community population. *Neurology*, *62*(9), 1573–1579. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000123250.82849.B6

Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods 2008 5:7*, *5*(7), 621–628. https://doi.org/10.1038/nmeth.1226

Mosconi, L., De Santi, S., Li, J., Tsui, W. H., Li, Y., Boppana, M., Laska, E., Rusinek, H., & de Leon, M. J. (2008). Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging. *Neurobiology of Aging*, *29*(5), 676–692. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2006.12.008

Mosconi, L., Pupi, A., & De Leon, M. J. (2008). Brain Glucose Hypometabolism and Oxidative Stress in Preclinical Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1147*(1), 180–195. https://doi.org/10.1196/ANNALS.1427.007

Mouser, P. E., Head, E., Ha, K. H., & Rohn, T. T. (2006). Caspase-Mediated Cleavage of Glial Fibrillary Acidic Protein within Degenerating Astrocytes of the Alzheimer's Disease Brain. *The American Journal of Pathology*, *168*(3), 936–946. https://doi.org/10.2353/AJPATH.2006.050798

Movassat, J., Delangre, E., Liu, J., Gu, Y. C., & Janel, N. (2019). Hypothesis and Theory: Circulating Alzheimer's-Related Biomarkers in Type 2 Diabetes. Insight From the Goto-Kakizaki Rat. *Frontiers in Neurology*, *10*(JUN), 649. https://doi.org/10.3389/FNEUR.2019.00649

Mrak, R. E., & Griffin, W. S. T. (2005). Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*, *26*(3), 349–354. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2004.05.010

Mucke, L., Yu, G. Q., McConlogue, L., Rockenstein, E. M., Abraham, C. R., & Masliah, E. (2000). Astroglial expression of human alpha(1)-antichymotrypsin enhances alzheimer-like pathology in amyloid protein precursor transgenic mice. *The American Journal of Pathology*, *157*(6), 2003–2010. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64839-0

Mulder, S. D., Veerhuis, R., Blankenstein, M. A., & Nielsen, H. M. (2012). The effect of amyloid associated proteins on the expression of genes involved in amyloid-β clearance by adult human astrocytes. *Experimental Neurology*, *233*(1), 373–379. https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2011.11.001

Müller, T., Meyer, H. E., Egensperger, R., & Marcus, K. (2008). The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics—Relevance for Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, *85*(4), 393–406. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2008.05.002

Musi, N., Valentine, J. M., Sickora, K. R., Baeuerle, E., Thompson, C. S., Shen, Q., & Orr, M. E. (2018). Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging Cell*, *17*(6), e12840. https://doi.org/10.1111/ACEL.12840

Mysona, B. A., Matragoon, S., Stephens, M., Mohamed, I. N., Farooq, A., Bartasis, M. L., Fouda, A. Y., Shanab, A. Y., Espinosa-Heidmann, D. G., & El-Remessy, A. B. (2015). Imbalance of the nerve growth factor and its precursor as a potential biomarker for diabetic retinopathy. *BioMed Research International*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/571456

Nagai, M., Re, D. B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T. M., Wichterle, H., & Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nature Neuroscience*, *10*(5), 615–622. https://doi.org/10.1038/NN1876

Nagele, R. G., D'Andrea, M. R., Anderson, W. J., & Wang, H. Y. (2002). Intracellular accumulation of β-amyloid1–42 in neurons is facilitated by the α7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *110*(2), 199–211. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00460-2

Nagele, Robert G., D'Andrea, M. R., Lee, H., Venkataraman, V., & Wang, H. Y. (2003). Astrocytes accumulate Aβ42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Research*, *971*(2), 197–209. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02361-8

Nakagami, Y., Nishimura, S., Murasugi, T., Kaneko, I., Meguro, M., Marumoto, S., Kogen, H., Koyama, K., & Oda, T. (2002). A novel β-sheet breaker, RS-0406, reverses amyloid β-induced cytotoxicity and impairment of long-term potentiation in vitro. *British Journal of Pharmacology*, *137*(5), 676–682. https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0704911

Nakayama, Y., Tamada, Y., Tsugawa, H., Bamba, T., & Fukusaki, E. (2014). Novel strategy for non-targeted isotope-assisted metabolomics by means of metabolic turnover and multivariate analysis. *Metabolites*, *4*(3), 722–739. https://doi.org/10.3390/metabo4030722

Nash, W. J., & Dunn, W. B. (2019). From mass to metabolite in human untargeted metabolomics: Recent advances in annotation of metabolites applying liquid chromatography-mass spectrometry data. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *120*, 115324. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2018.11.022

Naudé, P. J. W., Nyakas, C., E. Eiden, L., Ait-Ali, D., Heide, R., Engelborghs, S., Luiten, P. G. M., De Deyn, P. P., Boer, J. A., & Eisel, U. L. M. (2012). Lipocalin 2: novel component of proinflammatory signaling in Alzheimer's disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *26*(7), 2811–2823. https://doi.org/10.1096/FJ.11-202457

Naz, S., García, A., & Barbas, C. (2013). Multiplatform analytical methodology for metabolic fingerprinting of lung tissue. *Analytical Chemistry*, *85*(22), 10941–10948. https://doi.org/10.1021/AC402411N/SUPPL_FILE/AC402411N_SI_001.PDF

Nelson, N. J. (2001). Microarrays Have Arrived: Gene Expression Tool Matures. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *93*(7), 492–494. https://doi.org/10.1093/JNCI/93.7.492

Neniskyte, U., Neher, J. J., & Brown, G. C. (2011). Neuronal death induced by nanomolar amyloid β is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(46), 39904–39913. https://doi.org/10.1074/JBC.M111.267583/ATTACHMENT/23822CF0-BBCD-4592-9500-41F6A7D2FF1F/MMC1.PDF

Newington, J. T., Harris, R. A., & Cumming, R. C. (2013). Reevaluating Metabolism in Alzheimer's Disease from the Perspective of the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle Model. *Journal of Neurodegenerative Diseases*, *2013*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2013/234572

Niedowicz, D. M., Reeves, V. L., Platt, T. L., Kohler, K., Beckett, T. L., Powell, D. K., Lee, T. L., Sexton, T. R., Song, E. S., Brewer, L. D., Latimer, C. S., Kraner, S. D., Larson, K. L., Ozcan, S., Norris, C. M., Hersh, L. B., Porter, N. M., Wilcock, D. M., & Murphy, M. P. (2014). Obesity and diabetes cause cognitive dysfunction in the absence of accelerated β-amyloid deposition in a novel murine model of mixed or vascular dementia. *Acta Neuropathologica Communications*, *2*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-64/FIGURES/8

Nielsen, H. M., Mulder, S. D., Beliën, J. A. M., Musters, R. J. P., Eikelenboom, P., & Veerhuis, R. (2010). Astrocytic Aβ1-42 uptake is determined by Aβ-aggregation state and the presence of amyloid-associated proteins. *Glia*, *58*(10), 1235–1246. https://doi.org/10.1002/GLIA.21004

Nifli, A. P., Bosson-Kouamé, A., Papadopoulou, N., Kogia, C., Kampa, M., Castagnino, C., Stournaras, C., Vercauteren, J., & Castanas, E. (2005). Monomeric and oligomeric flavanols are agonists of membrane androgen receptors. *Experimental Cell Research*, *309*(2), 329–339. https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2005.06.011

Nilsson, M. I., Bourgeois, J. M., Nederveen, J. P., Leite, M. R., Hettinga, B. P., Bujak, A. L., May, L., Lin, E., Crozier, M., Rusiecki, D. R., Moffatt, C., Azzopardi, P., Young, J., Yang, Y., Nguyen, J., Adler, E., Lan, L., & Tarnopolsky, M. A. (2019). Lifelong aerobic exercise protects against inflammaging and cancer. *PLOS ONE*, *14*(1), e0210863. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0210863

Nisbet, R. M., Polanco, J. C., Ittner, L. M., & Götz, J. (2015). Tau aggregation and its interplay with amyloid-β. *Acta Neuropathologica*, *129*(2), 207–220. https://doi.org/10.1007/S00401-014-1371-2/FIGURES/4

Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Veeranna, Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahlijanian, M., Lau, L. F., & Duff, K. (2003). Cdk5 Is a Key Factor in Tau Aggregation and Tangle Formation In Vivo. *Neuron*, *38*(4), 555–565. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00259-9

Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wang, L., LaFrancois, J., Feinstein, B., Burns, M., Krishnamurthy, P., Wen, Y., Bhat, R., Lewis, J., Dickson, D., & Duff, K. (2005). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(19), 6990–6995. https://doi.org/10.1073/PNAS.0500466102

Noland, R. C., Koves, T. R., Seiler, S. E., Lum, H., Lust, R. M., Ilkayeva, O., Stevens, R. D., Hegardt, F. G., & Muoio, D. M. (2009). Carnitine Insufficiency Caused by Aging and Overnutrition Compromises Mitochondrial Performance and Metabolic Control *. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(34), 22840–22852. https://doi.org/10.1074/JBC.M109.032888

Norden, D. M., Muccigrosso, M. M., & Godbout, J. P. (2015). Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, *96*(PA), 29–41. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2014.10.028

Novais, E. J., Tran, V. A., Johnston, S. N., Darris, K. R., Roupas, A. J., Sessions, G. A., Shapiro, I. M., Diekman, B. O., & Risbud, M. V. (2021). Long-term treatment with senolytic drugs Dasatinib and Quercetin ameliorates age-dependent intervertebral disc degeneration in mice. *Nature Communications 2021 12:1*, *12*(1), 1–17. https://doi.org/10.1038/s41467-021-25453-2

Nuutinen, T., Suuronen, T., Kauppinen, A., & Salminen, A. (2009). Clusterin: A forgotten player in Alzheimer's disease.

Brain Research Reviews, *61*(2), 89–104. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2009.05.007

Nwaobi, S. E., Cuddapah, V. A., Patterson, K. C., Randolph, A. C., & Olsen, M. L. (2016). The role of glial-specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS. *Acta Neuropathologica 2016 132:1*, *132*(1), 1–21. https://doi.org/10.1007/S00401-016-1553-1

Oblak, A. L., Forner, S., Territo, P. R., Sasner, M., Carter, G. W., Howell, G. R., Sukoff-Rizzo, S. J., Logsdon, B. A., Mangravite, L. M., Mortazavi, A., Baglietto-Vargas, D., Green, K. N., Macgregor, G. R., Wood, M. A., Tenner, A. J., Laferla, F. M., & Lamb, B. T. (2020). Model organism development and evaluation for late-onset Alzheimer's disease: MODEL-AD. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, *6*(1), e12110. https://doi.org/10.1002/TRC2.12110

Oblak, A. L., Lin, P. B., Kotredes, K. P., Pandey, R. S., Garceau, D., Williams, H. M., Uyar, A., O'Rourke, R., O'Rourke, S., Ingraham, C., Bednarczyk, D., Belanger, M., Cope, Z. A., Little, G. J., Williams, S. P. G., Ash, C., Bleckert, A., Ragan, T., Logsdon, B. A., … Lamb, B. T. (2021). Comprehensive Evaluation of the 5XFAD Mouse Model for Preclinical Testing Applications: A MODEL-AD Study. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2021.713726

Obregon, D. F., Rezai-Zadeh, K., Bai, Y., Sun, N., Hou, H., Ehrhart, J., Zeng, J., Mori, T., Arendash, G. W., Shytle, D., Town, T., & Tan, J. (2006). ADAM10 Activation Is Required for Green Tea (–)-Epigallocatechin-3-gallate-induced α-Secretase Cleavage of Amyloid Precursor Protein *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(24), 16419–16427. https://doi.org/10.1074/JBC.M600617200

Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J. P., Cribbs, D. H., & LaFerla, F. M. (2004). Aβ Immunotherapy Leads to Clearance of Early, but Not Late, Hyperphosphorylated Tau Aggregates via the Proteasome. *Neuron*, *43*(3), 321–332. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2004.07.003

Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P., & LaFerla, F. M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*(8), 1063–1070. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2003.08.012

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kayed, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, *39*(3), 409–421. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3

Odibat, O., & Reddy, C. K. (2012). Ranking differential hubs in gene co-expression networks. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, *10*(1). https://doi.org/10.1142/S0219720012400021

Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., & Rodríguez, J. J. (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia*, *58*(7), 831–838. https://doi.org/10.1002/GLIA.20967

Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., & Rodríguez, J. J. (2011). Age-dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: mechanism for deficient glutamatergic transmission? *Molecular Neurodegeneration*, *6*(1), 55. https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-55

Olsen, M. L., Khakh, B. S., Skatchkov, S. N., Zhou, M., Lee, C. J., & Rouach, N. (2015). New Insights on Astrocyte Ion Channels: Critical for Homeostasis and Neuron-Glia Signaling. *Journal of Neuroscience*, *35*(41), 13827–13835. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2603-15.2015

Onken, B., & Driscoll, M. (2010). Metformin Induces a Dietary Restriction–Like State and the Oxidative Stress Response to Extend C. elegans Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLOS ONE*, *5*(1), e8758. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0008758

Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., & Yamada, M. (2003). Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *87*(1), 172–181. https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2003.01976.X/FULL

Onyango, I. G., Jauregui, G. V., Čarná, M., Bennett, J. P., & Stokin, G. B. (2021). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 5, p. 524). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. https://doi.org/10.3390/biomedicines9050524

Onyango, I. G., Lu, J., Rodova, M., Lezi, E., Crafter, A. B., & Swerdlow, R. H. (2010). Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1802*(1), 228–234. https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2009.07.014

Orgogozo, J. M., Gilman, S., Dartigues, J. F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L. C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., Michel, B. F., Boada, M., Frank, A., & Hock, C. (2003). Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Aβ42 immunization. *Neurology*, *61*(1), 46–54. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000073623.84147.A8

Ormel, L., Lauritzen, K. H., Schreiber, R., Kunzelmann, K., & Gundersen, V. (2020). GABA, but Not Bestrophin-1, Is Localized in Astroglial Processes in the Mouse Hippocampus and the Cerebellum. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *13*, 135. https://doi.org/10.3389/FNMOL.2020.00135/BIBTEX

Orr, M. E., Sullivan, A. C., & Frost, B. (2017). A Brief Overview of Tauopathy: Causes, Consequences, and Therapeutic Strategies. *Trends in Pharmacological Sciences*, *38*(7), 637–648. https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2017.03.011

Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Jansen, A. H. P., Kooijman, L., Bossers, K., & Hol, E. M. (2014). Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiology of Aging*, *35*(12), 2746–2760. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2014.06.004

Orta-Salazar, E., Vargas-Rodríguez, I., Castro-Chavira, S. A., Feria-Velasco, A. I., & Díaz-Cintra, S. (2016). Alzheimer's Disease: From Animal Models to the Human Syndrome. In *Update on Dementia*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/64619

Osborn, L. M., Kamphuis, W., Wadman, W. J., & Hol, E. M. (2016). Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, *144*, 121–141. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2016.01.001

Osenkowski, P., Ye, W., Wang, R., Wolfe, M. S., & Selkoe, D. J. (2008). Direct and potent regulation of γ-secretase by its lipid microenvironment. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(33), 22529–22540. https://doi.org/10.1074/JBC.M801925200/ATTACHMENT/C81BD5E2-395D-4E3C-8BA0-6274FB427B61/MMC1.PDF

Oshlack, A., Robinson, M. D., & Young, M. D. (2010). From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome Biology*, *11*(12), 1–10. https://doi.org/10.1186/GB-2010-11-12-220/FIGURES/2

Oshlack, A., & Wakefield, M. J. (2009). Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology. *Biology Direct*, *4*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-14/FIGURES/3

Ottestad-Hansen, S., Hu, Q. X., Follin-Arbelet, V. V., Bentea, E., Sato, H., Massie, A., Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2018). The cystine-glutamate exchanger (xCT, Slc7a11) is expressed in significant concentrations in a subpopulation of astrocytes in the mouse brain. *Glia*, *66*(5), 951–970. https://doi.org/10.1002/GLIA.23294

Overmyer, M., Kraszpulski, M., Helisalmi, S., Soininen, H., & Alafuzoff, I. (2000). DNA fragmentation, gliosis and histological hallmarks of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica 2000 100:6*, *100*(6), 681–687. https://doi.org/10.1007/S004010000228

Ovsepian, S. V., O'Leary, V. B., Zaborszky, L., Ntziachristos, V., & Dolly, J. O. (2019). Amyloid Plaques of Alzheimer's Disease as Hotspots of Glutamatergic Activity. *Neuroscientist*, *25*(4), 288–297. https://doi.org/10.1177/1073858418791128

Ozsolak, F., Platt, A. R., Jones, D. R., Reifenberger, J. G., Sass, L. E., McInerney, P., Thompson, J. F., Bowers, J., Jarosz, M., & Milos, P. M. (2009). Direct RNA sequencing. *Nature 2009 461:7265*, *461*(7265), 814–818. https://doi.org/10.1038/nature08390

Pagani, M., Nobili, F., Morbelli, S., Arnaldi, D., Giuliani, A., Öberg, J., Girtler, N., Brugnolo, A., Picco, A., Bauckneht, M., Piva, R., Chincarini, A., Sambuceti, G., Jonsson, C., & De Carli, F. (2017). Early identification of MCI converting to AD: a FDG PET study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2017 44:12*, *44*(12), 2042–2052. https://doi.org/10.1007/S00259-017-3761-X

Paglia, G., Stocchero, M., Cacciatore, S., Lai, S., Angel, P., Alam, M. T., Keller, M., Ralser, M., & Astarita, G. (2016). Unbiased Metabolomic Investigation of Alzheimer's Disease Brain Points to Dysregulation of Mitochondrial Aspartate Metabolism. *Journal of Proteome Research*, *15*(2), 608–618. https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.5B01020/SUPPL_FILE/PR5B01020_SI_001.PDF

Pajarillo, E., Rizor, A., Lee, J., Aschner, M., & Lee, E. (2019). The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology*, *161*, 107559. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2019.03.002

Panchal, M., Gaudin, M., Lazar, A. N., Salvati, E., Rivals, I., Ayciriex, S., Dauphinot, L., Dargère, D., Auzeil, N., Masserini, M., Laprévote, O., & Duyckaerts, C. (2014). Ceramides and sphingomyelinases in senile plaques. *Neurobiology of Disease*, *65*, 193–201. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2014.01.010

Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P.-É., Li, S., & Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*, *1*. https://doi.org/10.1093/nar/gkab382

Panza, F., Frisardi, V., Solfrizzi, V., Imbimbo, B. P., Logroscino, G., Santamato, A., Greco, A., Seripa, D., & Pilotto, A. (2012). Immunotherapy for Alzheimer's disease: from anti-β-amyloid to tau-based immunization strategies. *Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Imt.11.170*, *4*(2), 213–238. https://doi.org/10.2217/IMT.11.170

Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L., & Denko, N. C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism*, *3*(3), 187–197. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2006.01.012/ATTACHMENT/E7B3C5B5-A28A-429C-8C2A-DD6F3173B764/MMC1.PDF

Paradisi, S., Sacchetti, B., Balduzzi, M., Gaudi, S., & Malchiodi-Albedi, F. (2004). Astrocyte modulation of in vitro β-amyloid neurotoxicity. *Glia*, *46*(3), 252–260. https://doi.org/10.1002/GLIA.20005

Parajuli, B., Horiuchi, H., Mizuno, T., Takeuchi, H., & Suzumura, A. (2015). CCL11 enhances excitotoxic neuronal death by producing reactive oxygen species in microglia. *Glia*, *63*(12), 2274–2284. https://doi.org/10.1002/GLIA.22892

Park, J., Cheon, W., & Kim, K. (2020). Effects of Long-Term Endurance Exercise and Lithium Treatment on Neuroprotective Factors in Hippocampus of Obese Rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health 2020, Vol. 17, Page 3317*, *17*(9), 3317. https://doi.org/10.3390/IJERPH17093317

Park, J. I. A. E., LEE, S. U. N. Y. O. U. N. G., SHON, J., KIM, K., LEE, H. J., KIM, K. A., LEE, B. O. O. Y. O. N. G., OH, S. E. U. N. G. H. U. N., KIM, N. K., & KIM, O. J. (2019). Adalimumab improves cognitive impairment, exerts neuroprotective effects and attenuates neuroinflammation in an Aβ1-40-injected mouse model of Alzheimer's disease. *Cytotherapy*, *21*(6), 671–682. https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2019.04.054

Park, S. Y., Kim, H. Y., Park, H. J., Shin, H. K., Hong, K. W., & Kim, C. D. (2016). Concurrent Treatment with Taxifolin and Cilostazol on the Lowering of β-Amyloid Accumulation and Neurotoxicity via the Suppression of P-JAK2/P-STAT3/NF-κB/BACE1 Signaling Pathways. *PLOS ONE*, *11*(12), e0168286. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0168286

Parpura-Gill, A., Beitz, D., & Uemura, E. (1997). The inhibitory effects of β-amyloid on glutamate and glucose uptakes by cultured astrocytes. *Brain Research*, *754*(1–2), 65–71. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00043-7

Pasqualetti, P., Bonomini, C., Dal Forno, G., Paulon, L., Sinforiani, E., Marra, C., Zanetti, O., & Rossini, P. M. (2013). A randomized controlled study on effects of ibuprofen on cognitive progression of Alzheimer's disease. *Aging Clinical and Experimental Research 2009 21:2*, *21*(2), 102–110. https://doi.org/10.1007/BF03325217

Patil, S., Melrose, J., & Chan, C. (2007). Involvement of astroglial ceramide in palmitic acid-induced Alzheimer-like changes in primary neurons. *European Journal of Neuroscience*, *26*(8), 2131–2141. https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2007.05797.X

Patil, S., Sheng, L., Masserang, A., & Chan, C. (2006). Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons. *Neuroscience Letters*, *406*(1–2), 55–59. https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2006.07.015

Patro, R., Mount, S. M., & Kingsford, C. (2014). Sailfish enables alignment-free isoform quantification from RNA-seq reads using lightweight algorithms. *Nature Biotechnology 2014 32:5*, *32*(5), 462–464. https://doi.org/10.1038/nbt.2862

Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2012 13:4*, *13*(4), 263–269. https://doi.org/10.1038/nrm3314

Pedersen, J. T., & Sigurdsson, E. M. (2015). Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, *21*(6), 394–402. https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2015.03.003

Pedrós, I., Petrov, D., Allgaier, M., Sureda, F., Barroso, E., Beas-Zarate, C., Auladell, C., Pallàs, M., Vázquez-Carrera, M., Casadesús, G., Folch, J., & Camins, A. (2014). Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1842*(9), 1556–1566. https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2014.05.025

Pekny, M., & Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: Costs and benefits. *Physiological Reviews*, *94*(4), 1077–1098. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00041.2013/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0041427070009.JPEG

Pelvig, D. P., Pakkenberg, H., Regeur, L., Oster, S., & Pakkenberg, B. (2003). Neocortical Glial Cell Numbers in Alzheimer's Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *16*(4), 212–219. https://doi.org/10.1159/000072805

Pence, H. E., & Williams, A. (2010). ChemSpider: An Online Chemical Information Resource. *Journal of Chemical Education*, *87*(11), 1123–1124. https://doi.org/10.1021/ED100697W

Peralta, M. A., Santi, M. D., Agnese, A. M., Cabrera, J. L., & Ortega, M. G. (2014). Flavanoids from Dalea elegans: Chemical reassignment and determination of kinetics parameters related to their anti-tyrosinase activity. *Phytochemistry Letters*, *10*, 260–267. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.10.012

Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, *32*(8), 421–431. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2009.05.001

Perego, C., Vanoni, C., Bossi, M., Massari, S., Basudev, H., Longhi, R., & Pietrini, G. (2000). The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. *Journal of Neurochemistry*, *75*(3), 1076–1084. https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2000.0751076.X

Perez-Nievas, B. G., & Serrano-Pozo, A. (2018). Deciphering the astrocyte reaction in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*(APR), 114. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2018.00114/BIBTEX

Perez, E. J., Tapanes, S. A., Loris, Z. B., Balu, D. T., Sick, T. J., Coyle, J. T., & Liebl, D. J. (2017). Enhanced astrocytic d-serine underlies synaptic damage after traumatic brain injury. *The Journal of Clinical Investigation*, *127*(8), 3114–3125. https://doi.org/10.1172/JCI92300

Perini, G., Della-Bianca, V., Politi, V., Valle, G. Della, Dal-Pra, I., Rossi, F., & Armato, U. (2002). Role of p75 Neurotrophin Receptor in the Neurotoxicity by β-amyloid Peptides and Synergistic Effect of Inflammatory Cytokines. *Journal of Experimental Medicine*, *195*(7), 907–918. https://doi.org/10.1084/JEM.20011797

Pertusa, M., García-Matas, S., Rodríguez-Farré, E., Sanfeliu, C., & Cristòfol, R. (2007). Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *Journal of Neurochemistry*, *101*(3), 794–805. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.04369.X

Peters, O., Schipke, C. G., Philipps, A., Haas, B., Pannasch, U., Wang, L. P., Benedetti, B., Kingston, A. E., & Kettenmann, H. (2009). Astrocyte Function is Modified by Alzheimer's Disease-like Pathology in Aged Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, *18*(1), 177–189. https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1140

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(13), 1605–1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084

Pfrieger, F. W., & Ungerer, N. (2011). Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Progress in Lipid Research*, *50*(4), 357–371. https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2011.06.002

Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., Buch, R., Fiorin, G., Hénin, J., Jiang, W., McGreevy, R., Melo, M. C. R., Radak, B. K., Skeel, R. D., Singharoy, A., Wang, Y., Roux, B., Aksimentiev, A., Luthey-Schulten, Z., … Tajkhorshid, E. (2020). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *Journal of Chemical Physics*, *153*(4), 044130. https://doi.org/10.1063/5.0014475

Pickrell, J. K., Marioni, J. C., Pai, A. A., Degner, J. F., Engelhardt, B. E., Nkadori, E., Veyrieras, J. B., Stephens, M., Gilad, Y., &

Pritchard, J. K. (2010). Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. *Nature 2010 464:7289*, *464*(7289), 768–772. https://doi.org/10.1038/nature08872

Pihlaja, R., Koistinaho, J., Kauppinen, R., Sandholm, J., Tanila, H., & Koistinaho, M. (2011). Multiple cellular and molecular mechanisms Are involved in human Aβ clearance by transplanted adult astrocytes. *Glia*, *59*(11), 1643–1657. https://doi.org/10.1002/GLIA.21212

Pihlaja, R., Koistinaho, J., Malm, T., Sikkilä, H., Vainio, S., & Koistinaho, M. (2008). Transplanted astrocytes internalize deposited β-amyloid peptides in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Glia*, *56*(2), 154–163. https://doi.org/10.1002/GLIA.20599

Pike, C. J., Cummings, B. J., Monzavi, R., & Cotman, C. W. (1994). Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *63*(2), 517–531. https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90547-9

Pimplikar, S. W., Nixon, R. A., Robakis, N. K., Shen, J., & Tsai, L. H. (2010). Amyloid-Independent Mechanisms in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Journal of Neuroscience*, *30*(45), 14946–14954. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4305-10.2010

Porrini, V., Lanzillotta, A., Branca, C., Benarese, M., Parrella, E., Lorenzini, L., Calzà, L., Flaibani, R., Spano, P. F., Imbimbo, B. P., & Pizzi, M. (2015). CHF5074 (CSP-1103) induces microglia alternative activation in plaque-free Tg2576 mice and primary glial cultures exposed to beta-amyloid. *Neuroscience*, *302*, 112–120. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2014.10.029

Potokar, M., Morita, M., Wiche, G., & Jorgačevski, J. (2020). The Diversity of Intermediate Filaments in Astrocytes. *Cells*, *9*(7). https://doi.org/10.3390/CELLS9071604

Potter, A., Corwin, J., Lang, J., Piasecki, M., Lenox, R., & Newhouse, P. A. (1999). Acute effects of the selective cholinergic channel activator (nicotinic agonist) ABT-418 in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology 1999 142:4*, *142*(4), 334–342. https://doi.org/10.1007/S002130050897

Prasad, V. V. T. S., Nithipatikom, K., & Harder, D. R. (2008). Ceramide elevates 12-hydroxyeicosatetraenoic acid levels and upregulates 12-lipoxygenase in rat primary hippocampal cell cultures containing predominantly astrocytes. *Neurochemistry International*, *53*(6–8), 220–229. https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2008.07.002

Price, J. L., & Morris, J. C. (1999). Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, *45*(3), 358–368. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1531-8249(199903)45:3<358::AID-ANA12>3.0.CO;2-X

Prickett, C., Brennan, L., & Stolwyk, R. (2015). Examining the relationship between obesity and cognitive function: A systematic literature review. *Obesity Research & Clinical Practice*, *9*(2), 93–113. https://doi.org/10.1016/J.ORCP.2014.05.001

Prillaman, M. (2022). Heralded Alzheimer's drug works - but safety concerns loom. *Nature*, *612*(7939), 197–198. https://doi.org/10.1038/D41586-022-04240-Z

Prince, M. J., Wimo, A., Guerchet, M. M., Ali, G. C., Wu, Y.-T., & Prina, M. (2015). World Alzheimer Report 2015 - The Global Impact of Dementia. In *An analysis of prevalence, incidence, cost and trends*. Alzheimer's Disease International.

Prokopenko, D., Morgan, S. L., Mullin, K., Hofmann, O., Chapman, B., Kirchner, R., Amberkar, S., Wohlers, I., Lange, C., Hide, W., Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2021). Whole-genome sequencing reveals new Alzheimer's disease–associated rare variants in loci related to synaptic function and neuronal development. *Alzheimer's & Dementia*, *17*(9), 1509–1527. https://doi.org/10.1002/ALZ.12319

Protas, H. D., Chen, K., Langbaum, J. B. S., Fleisher, A. S., Alexander, G. E., Lee, W., Bandy, D., De Leon, M. J., Mosconi, L., Buckley, S., Truran-Sacrey, D., Schuff, N., Weiner, M. W., Caselli, R. J., & Reiman, E. M. (2013). Posterior Cingulate Glucose Metabolism, Hippocampal Glucose Metabolism, and Hippocampal Volume in Cognitively Normal, Late-Middle-Aged Persons at 3 Levels of Genetic Risk for Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, *70*(3), 320–325. https://doi.org/10.1001/2013.JAMANEUROL.286

Putri, S. P., Nakayama, Y., Matsuda, F., Uchikata, T., Kobayashi, S., Matsubara, A., & Fukusaki, E. (2013). Current metabolomics: Practical applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *115*(6), 579–589.

https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2012.12.007

Puzzo, D., Gulisano, W., Arancio, O., & Palmeri, A. (2015). The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in Aβ physiology. *Neuroscience*, *307*, 26–36. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.08.039

Qin, L., Zhang, J., & Qin, M. (2013). Protective effect of cyanidin 3-O-glucoside on beta-amyloid peptide-induced cognitive impairment in rats. *Neuroscience Letters*, *534*(1), 285–288. https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2012.12.023

Quadros Gomes, B. A., Bastos Silva, J. P., Rodrigues Romeiro, C. F., dos Santos, S. M., Rodrigues, C. A., Gonçalves, P. R., Sakai, J. T., Santos Mendes, P. F., Pompeu Varela, E. L., & Monteiro, M. C. (2018). Neuroprotective mechanisms of resveratrol in Alzheimer's disease: Role of SIRT1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/8152373

Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMra0909142*, *362*(4), 329–344. https://doi.org/10.1056/NEJMRA0909142

Rachmany, L., Tweedie, D., Li, Y., Rubovitch, V., Holloway, H. W., Miller, J., Hoffer, B. J., Greig, N. H., & Pick, C. G. (2013). Exendin-4 induced glucagon-like peptide-1 receptor activation reverses behavioral impairments of mild traumatic brain injury in mice. *Age*, *35*(5), 1621. https://doi.org/10.1007/S11357-012-9464-0

Radak, Z., Suzuki, K., Higuchi, M., Balogh, L., Boldogh, I., & Koltai, E. (2016). Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. *Free Radical Biology and Medicine*, *98*, 187–196. https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.01.024

Rahimifard, M., Maqbool, F., Moeini-Nodeh, S., Niaz, K., Abdollahi, M., Braidy, N., Nabavi, S. M., & Nabavi, S. F. (2017). Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: A novel therapeutic strategy for neuroinflammation. *Ageing Research Reviews*, *36*, 11–19. https://doi.org/10.1016/J.ARR.2017.02.004

Raina, A. K., Zhu, X., Rottkamp, C. A., Monteiro, M., Takeda, A., & Smith, M. A. (2000). Cyclin' toward dementia. *Journal of Neuroscience Research*, *61*(2), 128–133. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-4547(20000715)61:2<128::AID-JNR2>3.0.CO;2-H

Rainbolt, T. K., Saunders, J. M., & Wiseman, R. L. (2014). Stress-responsive regulation of mitochondria through the ER unfolded protein response. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *25*(10), 528–537. https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.007

Ramos-Gonzalez, P., Mato, S., Chara, J. C., Verkhratsky, A., Matute, C., & Cavaliere, F. (2021). Astrocytic atrophy as a pathological feature of Parkinson's disease with LRRK2 mutation. *Npj Parkinson's Disease*, *7*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41531-021-00175-w

Rao, M. S., Van Vleet, T. R., Ciurlionis, R., Buck, W. R., Mittelstadt, S. W., Blomme, E. A. G., & Liguori, M. J. (2019). Comparison of RNA-Seq and microarray gene expression platforms for the toxicogenomic evaluation of liver from short-term rat toxicity studies. *Frontiers in Genetics*, *10*(JAN), 636. https://doi.org/10.3389/FGENE.2018.00636/BIBTEX

Rao, S. G., & Jackson, J. G. (2016). SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! *Trends in Cancer*, *2*(11), 676–687. https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2016.10.001

Raterink, R. J., Lindenburg, P. W., Vreeken, R. J., & Hankemeier, T. (2013). Three-phase electroextraction: A new (Online) sample purification and enrichment method for bioanalysis. *Analytical Chemistry*, *85*(16), 7762–7768. https://doi.org/10.1021/AC4010716/SUPPL_FILE/AC4010716_SI_004.PDF

Reardon, S. (2023). FDA approves Alzheimer's drug lecanemab amid safety concerns. *Nature*, *613*(7943), 227–228. https://doi.org/10.1038/D41586-023-00030-3

Reddy, P. H. (2014). Increased mitochondrial fission and neuronal dysfunction in Huntington's disease: implications for molecular inhibitors of excessive mitochondrial fission. *Drug Discovery Today*, *19*(7), 951. https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2014.03.020

Refolo, L. M., Pappolla, M. A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S. D., Thomas-Bryant, T., Tint, G. S., Wang, R., Mercken, M., Petanceska, S. S., & Duff, K. E. (2001). A Cholesterol-Lowering Drug Reduces β-Amyloid Pathology in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Disease*, *8*(5), 890–899. https://doi.org/10.1006/NBDI.2001.0422

Reines, S. A., Block, G. A., Morris, J. C., Liu, G., Nessly, M. L., Lines, C. R., Norman, B. A., & Baranak, C. C. (2004). Rofecoxib: no effect on Alzheimer's disease in a 1-year, randomized, blinded, controlled study. *Neurology*, *62*(1), 66–71. https://doi.org/10.1212/WNL.62.1.66

Reitz, C. (2012). Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: A critical review. *International Journal of Alzheimer's Disease*. https://doi.org/10.1155/2012/369808

Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology 2011 7:3*, *7*(3), 137–152. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.2

Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, *88*(4), 640–651. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024

Reitzer, L. J., Wice, B. M., & Kennel1, D. (1979). Evidence That Glutamine, Not Sugar, Is the Major Energy Source for Cultured HeLa Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, *254*(8), 2669–2676. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30124-2

Ren, S., Hinzman, A. A., Kang, E. L., Szczesniak, R. D., & Lu, L. J. (2015). Computational and statistical analysis of metabolomics data. *Metabolomics 2015 11:6*, *11*(6), 1492–1513. https://doi.org/10.1007/S11306-015-0823-6

Rentz, D. M., Locascio, J. J., Becker, J. A., Moran, E. K., Eng, E., Buckner, R. L., Sperling, R. A., & Johnson, K. A. (2010). Cognition, reserve, and amyloid deposition in normal aging. *Annals of Neurology*, *67*(3), 353–364. https://doi.org/10.1002/ANA.21904

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, *49*(11), 1603–1616. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006

Rezai-Zadeh, K., Arendash, G. W., Hou, H., Fernandez, F., Jensen, M., Runfeldt, M., Shytle, R. D., & Tan, J. (2008). Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces β-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. *Brain Research*, *1214*, 177–187. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.02.107

Rezai-Zadeh, K., Douglas Shytle, R., Bai, Y., Tian, J., Hou, H., Mori, T., Zeng, J., Obregon, D., Town, T., & Tan, J. (2009). Flavonoid-mediated presenilin-1 phosphorylation reduces Alzheimer's disease β-amyloid production. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(3), 574–588. https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2008.00344.X

Rezai-Zadeh, K., Shytle, D., Sun, N., Mori, T., Hou, H., Jeanniton, D., Ehrhart, J., Townsend, K., Zeng, J., Morgan, D., Hardy, J., Town, T., & Tan, J. (2005). Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Modulates Amyloid Precursor Protein Cleavage and Reduces Cerebral Amyloidosis in Alzheimer Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience*, *25*(38), 8807–8814. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1521-05.2005

Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., Rudack, T., Stone, J. E., Phillips, J. C., Freddolino, P. L., & Schulten, K. (2016). QwikMD — Integrative Molecular Dynamics Toolkit for Novices and Experts. *Scientific Reports 2016 6:1*, *6*(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/srep26536

Rigby, M. J., Gomez, T. M., & Puglielli, L. (2020). Glial Cell-Axonal Growth Cone Interactions in Neurodevelopment and Regeneration. *Frontiers in Neuroscience*, *14*, 203. https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.00203/BIBTEX

Rissman, R. A., De Blas, A. L., & Armstrong, D. M. (2007). GABAA receptors in aging and Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *103*(4), 1285–1292. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2007.04832.X

Risso, D., Schwartz, K., Sherlock, G., & Dudoit, S. (2011). GC-Content Normalization for RNA-Seq Data. *BMC Bioinformatics*, *12*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-480/FIGURES/7

Ritchie, C. W., Ames, D., Clayton, T., & Lai, R. (2004). Metaanalysis of Randomized Trials of the Efficacy and Safety of Donepezil, Galantamine, and Rivastigmine for the Treatment of Alzheimer Disease. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, *12*(4), 358–369. https://doi.org/10.1097/00019442-200407000-00003

Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, *43*(7), e47. https://doi.org/10.1093/nar/gkv007

Rivera-Marrero, S., Bencomo-Martínez, A., Orta Salazar, E., Sablón-Carrazana, M., García-Pupo, L., Zoppolo, F., Arredondo, F., Dapueto, R., Daniela Santi, M., Kreimerman, I., Pardo, T., Reyes, L., Galán, L., León-Chaviano, S., Espinosa-Rodríguez, L. A., Menéndez-Soto del Valle, R., Savio, E., Díaz Cintra, S., & Rodríguez-Tanty, C. (2020). A new naphthalene derivative with anti-amyloidogenic activity as potential therapeutic agent for Alzheimer's disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *28*(20), 115700. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115700

Robakis, N. K. (2011). Mechanisms of AD neurodegeneration may be independent of Aβ and its derivatives. *Neurobiology of Aging*, *32*(3), 372–379. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2010.05.022

Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted Metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, *98*(1), 30.2.1-30.2.24. https://doi.org/10.1002/0471142727.MB3002S98

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, *26*(1), 139–140. https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btp616

Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*, *11*(3), 1–9. https://doi.org/10.1186/GB-2010-11-3-R25/FIGURES/3

Robinson, M. D., & Smyth, G. K. (2007). Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance. *Bioinformatics*, *23*(21), 2881–2887. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTM453

Rodriguez-Vieitez, E., Saint-Aubert, L., Carter, S. F., Almkvist, O., Farid, K., Schöll, M., Chiotis, K., Thordardottir, S., Graff, C., Wall, A., Långström, B., & Nordberg, A. (2016). Diverging longitudinal changes in astrocytosis and amyloid PET in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Brain*, *139*(3), 922–936. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWV404

Roßner, S., Lange-Dohna, C., Zeitschel, U., & Perez-Polo, J. R. (2005). Alzheimer's disease β-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *Journal of Neurochemistry*, *92*(2), 226–234. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2004.02857.X

Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, L. J., & Kuncl, R. W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, *38*(1), 73–84. https://doi.org/10.1002/ANA.410380114

Rouach, N., Avignone, E., Même, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F., & Giaume, C. (2002). Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biology of the Cell*, *94*(7–8), 457–475. https://doi.org/10.1016/S0248-4900(02)00016-3

Roussotte, F. F., Gutman, B. A., Madsen, S. K., Colby, J. B., & Thompson, P. M. (2014). Combined Effects of Alzheimer Risk Variants in the CLU and ApoE Genes on Ventricular Expansion Patterns in the Elderly. *The Journal of Neuroscience*, *34*(19), 6537. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5236-13.2014

Rubakhin, S. S., Romanova, E. V., Nemes, P., & Sweedler, J. V. (2011). Profiling metabolites and peptides in single cells. *Nature Methods*, *8*(4 Suppl), S20–S29. https://doi.org/10.1038/NMETH.1549

Rungratanawanich, W., Qu, Y., Wang, X., Essa, M. M., & Song, B. J. (2021). Advanced glycation end products (AGEs) and other adducts in aging-related diseases and alcohol-mediated tissue injury. *Experimental & Molecular Medicine 2021 53:2*, *53*(2), 168–188. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00561-7

Russo, G. L., Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., Iannitti, R., & Palumbo, R. (2014). Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. *Cancer Treatment and Research*, *159*, 185–205. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38007-5_11

Russo, I., Caracciolo, L., Tweedie, D., Choi, S. H., Greig, N. H., Barlati, S., & Bosetti, F. (2012). 3,6′-Dithiothalidomide, a new TNF-α synthesis inhibitor, attenuates the effect of Aβ1–42 intracerebroventricular injection on hippocampal neurogenesis and memory deficit. *Journal of Neurochemistry*, *122*(6), 1181–1192. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2012.07846.X

Ryu, K. Y., Lee, H. J., Woo, H., Kang, R. J., Han, K. M., Park, H. H., Lee, S. M., Lee, J. Y., Jeong, Y. J., Nam, H. W., Nam, Y., & Hoe, H. S. (2019). Dasatinib regulates LPS-induced microglial and astrocytic neuroinflammatory responses by inhibiting AKT/STAT3 signaling. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 1–36. https://doi.org/10.1186/S12974-019-1561-X/FIGURES/17

Sabogal-Guáqueta, A. M., Muñoz-Manco, J. I., Ramírez-Pineda, J. R., Lamprea-Rodriguez, M., Osorio, E., & Cardona-Gómez, G. P. (2015). The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*, *93*, 134–145. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2015.01.027

Saccon, T. D., Nagpal, R., Yadav, H., Cavalcante, M. B., Nunes, A. D. D. C., Schneider, A., Gesing, A., Hughes, B., Yousefzadeh, M., Tchkonia, T., Kirkland, J. L., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., & Masternak, M. M. (2021). Senolytic Combination of Dasatinib and Quercetin Alleviates Intestinal Senescence and Inflammation and Modulates the Gut Microbiome in Aged Mice. *The Journals of Gerontology: Series A*, *76*(11), 1895–1905. https://doi.org/10.1093/GERONA/GLAB002

Sadhukhan, P., Saha, S., Dutta, S., Mahalanobish, S., & Sil, P. C. (2018). Nutraceuticals: An emerging therapeutic approach against the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, *129*, 100–114. https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2017.11.028

Saeys, Y., Inza, I., & Larrañaga, P. (2007). A review of feature selection techniques in bioinformatics. *Bioinformatics*, *23*(19), 2507–2517. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTM344

Saez-Atienzar, S., & Masliah, E. (2020). Cellular senescence and Alzheimer disease: the egg and the chicken scenario. *Nature Reviews Neuroscience 2020 21:8*, *21*(8), 433–444. https://doi.org/10.1038/s41583-020-0325-z

Sáez, E. T., Pehar, M., Vargas, M. R., Barbeito, L., & Maccioni, R. B. (2006). Production of nerve growth factor by β-amyloid-stimulated astrocytes induces p75NTR-dependent tau hyperphosphorylation in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, *84*(5), 1098–1106. https://doi.org/10.1002/JNR.20996

Sagara, J. -i, Miura, K., & Bannai, S. (1993). Maintenance of Neuronal Glutathione by Glial Cells. *Journal of Neurochemistry*, *61*(5), 1672–1676. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1993.TB09802.X

Sagheddu, C., Melis, M., Muntoni, A. L., & Pistis, M. (2021). Repurposing Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists in Neurological and Psychiatric Disorders. *Pharmaceuticals 2021, Vol. 14, Page 1025*, *14*(10), 1025. https://doi.org/10.3390/PH14101025

Sagin, F., & Sozmen, E. (2008). Lipids as Key Players in Alzheimer Disease - Alterations in Metabolism and Genetics. *Current Alzheimer Research*, *5*(1), 4–14. https://doi.org/10.2174/156720508783884648

Sakono, M., & Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of Aβ oligomers. *The FEBS Journal*, *277*(6), 1348–1358. https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2010.07568.X

Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., & Schroeder, M. (2015). PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W443–W447. https://doi.org/10.1093/nar/gkv315

Salminen, A., Ojala, J., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Hiltunen, M., & Soininen, H. (2011). Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *The European Journal of Neuroscience*, *34*(1), 3–11. https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2011.07738.X

Salvadó, L., Palomer, X., Barroso, E., & Vázquez-Carrera, M. (2015). Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *26*(8), 438–448. https://doi.org/10.1016/J.TEM.2015.05.007

Sama, D. M., Abdul, H. M., Furman, J. L., Artiushin, I. A., Szymkowski, D. E., Scheff, S. W., & Norris, C. M. (2012). Inhibition of Soluble Tumor Necrosis Factor Ameliorates Synaptic Alterations and Ca2+ Dysregulation in Aged Rats. *PLOS ONE*, *7*(5), e38170. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0038170

Samali, A., Fitzgerald, U., Deegan, S., & Gupta, S. (2010). Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. In *International Journal of Cell Biology* (Vol. 2010). Int J Cell Biol. https://doi.org/10.1155/2010/830307

Sambra, V., Echeverria, F., Valenzuela, A., Chouinard-Watkins, R., & Valenzuela, R. (2021). Docosahexaenoic and Arachidonic Acids as Neuroprotective Nutrients throughout the Life Cycle. *Nutrients 2021, Vol. 13, Page 986*, *13*(3), 986. https://doi.org/10.3390/NU13030986

Sánchez-Valle, J., Tejero, H., Ibáñez, K., Portero, J. L., Krallinger, M., Al-Shahrour, F., Tabarés-Seisdedos, R., Baudot, A., & Valencia, A. (2017). A molecular hypothesis to explain direct and inverse co-morbidities between Alzheimer's Disease, Glioblastoma and Lung cancer. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-

017-04400-6

Santi, M. D., Arredondo, F., Carvalho, D., Echeverry, C., Prunell, G., Peralta, M. A., Cabrera, J. L., Ortega, M. G., Savio, E., & Abin-Carriquiry, J. A. (2020). Neuroprotective effects of prenylated flavanones isolated from Dalea species, in vitro and in silico studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *206*, 112718. https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112718

Santi, M. D., Peralta, M. A., Mendoza, C. S., Cabrera, J. L., & Ortega, M. G. (2017). *Chemical and bioactivity of flavanones obtained from roots of Dalea pazensis Rusby*. *27*(8), 1789–1794. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.058

Sapcariu, S. C., Kanashova, T., Weindl, D., Ghelfi, J., Dittmar, G., & Hiller, K. (2014). Simultaneous extraction of proteins and metabolites from cells in culture. *MethodsX*, *1*(1), 74–80. https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.07.002

Sarafian, T. A., Montes, C., Imura, T., Qi, J., Coppola, G., Geschwind, D. H., & Sofroniew, M. V. (2010). Disruption of Astrocyte STAT3 Signaling Decreases Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress In Vitro. *PLOS ONE*, *5*(3), e9532. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0009532

Sasaguri, H., Hashimoto, S., Watamura, N., Sato, K., Takamura, R., Nagata, K., Tsubuki, S., Ohshima, T., Yoshiki, A., Sato, K., Kumita, W., Sasaki, E., Kitazume, S., Nilsson, P., Winblad, B., Saito, T., Iwata, N., & Saido, T. C. (2022). Recent Advances in the Modeling of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, *16*, 334. https://doi.org/10.3389/FNINS.2022.807473/BIBTEX

Satoh, J., Tabunoki, H., Ishida, T., Saito, Y., & Arima, K. (2013). Accumulation of a repulsive axonal guidance molecule RGMa in amyloid plaques: a possible hallmark of regenerative failure in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *39*(2), 109–120. https://doi.org/10.1111/J.1365-2990.2012.01281.X

Savchenko, E., Teku, G. N., Boza-Serrano, A., Russ, K., Berns, M., Deierborg, T., Lamas, N. J., Wichterle, H., Rothstein, J., Henderson, C. E., Vihinen, M., & Roybon, L. (2019). FGF family members differentially regulate maturation and proliferation of stem cell-derived astrocytes. *Scientific Reports 2019 9:1*, *9*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46110-1

Sawmiller, D., Habib, A., Li, S., Darlington, D., Hou, H., Tian, J., Shytle, R. D., Smith, A., Giunta, B., Mori, T., & Tan, J. (2016). Diosmin reduces cerebral Aβ levels, tau hyperphosphorylation, neuroinflammation, and cognitive impairment in the 3xTg-AD mice. *Journal of Neuroimmunology*, *299*, 98–106. https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2016.08.018

Schaffer, S., & Kim, H. W. (2018). Effects and Mechanisms of Taurine as a Therapeutic Agent. *Biomolecules & Therapeutics*, *26*(3), 225–241. https://doi.org/10.4062/BIOMOLTHER.2017.251

Schägger, H. (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1555*(1–3), 154–159. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00271-2

Scharf, S., Mander, A., Ugoni, A., Vajda, F., & Christophidis, N. (1999). A double-blind, placebo-controlled trial of diclofenac/misoprostol in Alzheimer's disease. *Neurology*, *53*(1), 197–197. https://doi.org/10.1212/WNL.53.1.197

Scharpf, R. B., Irizarry, R. A., Ritchie, M. E., Carvalho, B., & Ruczinski, I. (2011). Using the R Package crlmm for Genotyping and Copy Number Estimation. *Journal of Statistical Software*, *40*(12), 1. https://doi.org/10.18637/jss.v040.i12

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guldo, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., … Seubert, P. (1999). Immunization with amyloid-β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature 1999 400:6740*, *400*(6740), 173–177. https://doi.org/10.1038/22124

Schmitz, M. L., Shaban, M. S., Albert, B. V., Gökçen, A., & Kracht, M. (2018). The Crosstalk of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Pathways with NF-κB: Complex Mechanisms Relevant for Cancer, Inflammation and Infection. *Biomedicines 2018, Vol. 6, Page 58*, *6*(2), 58. https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES6020058

Scholz, M., Gatzek, S., Sterling, A., Fiehn, O., & Selbig, J. (2004). Metabolite fingerprinting: detecting biological features by independent component analysis. *Bioinformatics*, *20*(15), 2447–2454. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTH270

Schousboe, A., Wellendorph, P., Frølund, B., Clausen, R. P., & Krogsgaard-Larsen, P. (2017). Astrocytic GABA Transporters:

Pharmacological Properties and Targets for Antiepileptic Drugs. *Advances in Neurobiology*, *16*, 283–296. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55769-4_14

Schubert, D., & Piasecki, D. (2001). Oxidative Glutamate Toxicity Can Be a Component of the Excitotoxicity Cascade. *Journal of Neuroscience*, *21*(19), 7455–7462. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-19-07455.2001

Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., & Hollender, J. (2014). Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. *Environmental Science and Technology*, *48*(4), 2097–2098. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24476540/

Scimemi, A., Meabon, J. S., Woltjer, R. L., Sullivan, J. M., Diamond, J. S., & Cook, D. G. (2013). Amyloid-β1–42 Slows Clearance of Synaptically Released Glutamate by Mislocalizing Astrocytic GLT-1. *Journal of Neuroscience*, *33*(12), 5312–5318. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5274-12.2013

Scott, H. A., Gebhardt, F. M., Mitrovic, A. D., Vandenberg, R. J., & Dodd, P. R. (2011). Glutamate transporter variants reduce glutamate uptake in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *32*(3), 553.e1-553.e11. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2010.03.008

Seaks, C. E., & Wilcock, D. M. (2020). Infectious hypothesis of Alzheimer disease. *PLoS Pathogens*, *16*(11). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008596

Seidl, R., Cairns, N., Singewald, N., Kaehler, S. T., & Lubec, G. (2001). Differences between GABA levels in Alzheimer's disease and Down syndrome with Alzheimer-like neuropathology. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2000 363:2*, *363*(2), 139–145. https://doi.org/10.1007/S002100000346

Sekar, A., Bialas, A. R., De Rivera, H., Davis, A., Hammond, T. R., Kamitaki, N., Tooley, K., Presumey, J., Baum, M., Van Doren, V., Genovese, G., Rose, S. A., Handsaker, R. E., Daly, M. J., Carroll, M. C., Stevens, B., & McCarroll, S. A. (2016). Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature*, *530*(7589), 177–183. https://doi.org/10.1038/NATURE16549

Sekar, S., McDonald, J., Cuyugan, L., Aldrich, J., Kurdoglu, A., Adkins, J., Serrano, G., Beach, T. G., Craig, D. W., Valla, J., Reiman, E. M., & Liang, W. S. (2015). Alzheimer's disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes. *Neurobiology of Aging*, *36*(2), 583–591. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2014.09.027

Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science*, *298*(5594), 789–791. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1074069

Seong, K. J., Lee, H. G., Kook, M. S., Ko, H. M., Jung, J. Y., & Kim, W. J. (2015). Epigallocatechin 3 gallate rescues LpS impaired adult hippocampal neurogenesis through suppressing the TLR4 NF-κB signaling pathway in mice. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, *20*(1), 41–51. https://doi.org/10.4196/KJPP.2016.20.1.41

Serrano-Pozo, A., Gómez-Isla, T., Growdon, J. H., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2013). A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease. *American Journal of Pathology*, *182*(6), 2332–2344. https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2013.02.031/ATTACHMENT/E7AF1557-BB37-4A6A-B6E0-8F05586B625A/MMC1.PDF

Serrano-Pozo, A., Mielke, M. L., Gómez-Isla, T., Betensky, R. A., Growdon, J. H., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2011). Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, *179*(3), 1373–1384. https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2011.05.047/ATTACHMENT/6651995A-31CC-4015-BF41-163078AD7C16/MMC3.DOC

Shabbir, U., Arshad, M. S., Sameen, A., & Oh, D. H. (2021). Crosstalk between Gut and Brain in Alzheimer's Disease: The Role of Gut Microbiota Modulation Strategies. *Nutrients 2021, Vol. 13, Page 690*, *13*(2), 690. https://doi.org/10.3390/NU13020690

Shaw, C. E., Al-Chalabi, A., & Leigh, N. (2001). Progress in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Current Neurology and Neuroscience Reports 2001 1:1*, *1*(1), 69–76. https://doi.org/10.1007/S11910-001-0078-7

Shen, Z. X. (2004). Brain cholinesterases: II. The molecular and cellular basis of Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, *63*(2), 308–321. https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2004.02.031

Sheng, X., Nenseth, H. Z., Qu, S., Kuzu, O. F., Frahnow, T., Simon, L., Greene, S., Zeng, Q., Fazli, L., Rennie, P. S., Mills, I. G., Danielsen, H., Theis, F., Patterson, J. B., Jin, Y., & Saatcioglu, F. (2019). IRE1α-XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling. *Nature Communications 2019 10:1*, *10*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41467-018-08152-3

Sherif, F., Gottfries, C. G., Alafuzoff, I., & Oreland, L. (1992). Brain gamma-aminobutyrate aminotransferase (GABA-T) and monoamine oxidase (MAO) in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission - Parkinson's Disease and Dementia Section 1992 4:3*, *4*(3), 227–240. https://doi.org/10.1007/BF02260906

Shi, Y., & Holtzman, D. M. (2018). Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight. *Nature Reviews. Immunology*, *18*(12). https://doi.org/10.1038/S41577-018-0051-1

Shin, H. S., Ryu, E. S., Oh, E. S., & Kang, D. H. (2015). Endoplasmic reticulum stress as a novel target to ameliorate epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis of human peritoneal mesothelial cells. *Laboratory Investigation 2015 95:10*, *95*(10), 1157–1173. https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.91

Shinohara, R. T., Sweeney, E. M., Goldsmith, J., Shiee, N., Mateen, F. J., Calabresi, P. A., Jarso, S., Pham, D. L., Reich, D. S., & Crainiceanu, C. M. (2014). Statistical normalization techniques for magnetic resonance imaging. *NeuroImage: Clinical*, *6*, 9–19. https://doi.org/10.1016/J.NICL.2014.08.008

Shioi, J., Georgakopoulos, A., Mehta, P., Kouchi, Z., Litterst, C. M., Baki, L., & Robakis, N. K. (2007). FAD mutants unable to increase neurotoxic Aβ 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on Aβ. *Journal of Neurochemistry*, *101*(3), 674–681. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.04391.X

Shulaev, V. (2006). Metabolomics technology and bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*, *7*(2), 128–139. https://doi.org/10.1093/BIB/BBL012

Sidhaye, J., & Knoblich, J. A. (2020). Brain organoids: an ensemble of bioassays to investigate human neurodevelopment and disease. *Cell Death & Differentiation 2020 28:1*, *28*(1), 52–67. https://doi.org/10.1038/s41418-020-0566-4

Siegel, P. M., & Ursini-Siegel, J. (2021). Tumor metabolic reprogramming in therapeutic resistance. *Biological Mechanisms and the Advancing Approaches to Overcoming Cancer Drug Resistance*, 199–225. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821310-0.00005-X

Silva, R. R., Jourdan, F., Salvanha, D. M., Letisse, F., Jamin, E. L., Guidetti-Gonzalez, S., Labate, C. A., & Vêncio, R. Z. N. (2014). ProbMetab: an R package for Bayesian probabilistic annotation of LC–MS-based metabolomics. *Bioinformatics*, *30*(9), 1336–1337. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU019

Simpson, J. E., Ince, P. G., Lace, G., Forster, G., Shaw, P. J., Matthews, F., Savva, G., Brayne, C., & Wharton, S. B. (2010). Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiology of Aging*, *31*(4), 578–590. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2008.05.015

Sims, R., Van Der Lee, S. J., Naj, A. C., Bellenguez, C., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Kunkle, B. W., Boland, A., Raybould, R., Bis, J. C., Martin, E. R., Grenier-Boley, B., Heilmann-Heimbach, S., Chouraki, V., Kuzma, A. B., Sleegers, K., Vronskaya, M., Ruiz, A., Graham, R. R., … Schellenberg, G. D. (2017). Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Genetics 2017 49:9*, *49*(9), 1373–1384. https://doi.org/10.1038/ng.3916

Singh, S., Nagalakshmi, D., Sharma, K. K., & Ravichandiran, V. (2021). Natural antioxidants for neuroinflammatory disorders and possible involvement of Nrf2 pathway: A review. *Heliyon*, *7*(2), e06216. https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E06216

Sloan, S. A., Darmanis, S., Huber, N., Khan, T. A., Birey, F., Caneda, C., Reimer, R., Quake, S. R., Barres, B. A., & Paşca, S. P. (2017). Human Astrocyte Maturation Captured in 3D Cerebral Cortical Spheroids Derived from Pluripotent Stem Cells. *Neuron*, *95*(4), 779-790.e6. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.035

Smale, G., Nichols, N. R., Brady, D. R., Finch, C. E., & Horton, W. E. (1995). Evidence for Apoptotic Cell Death in Alzheimer's Disease. *Experimental Neurology*, *133*(2), 225–230. https://doi.org/10.1006/EXNR.1995.1025

Smith, C. A., O'Maille, G., Want, E. J., Qin, C., Trauger, S. A., Brandon, T. R., Custodio, D. E., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2005). METLIN: A metabolite mass spectral database. *Therapeutic Drug Monitoring*, *27*(6), 747–751. https://doi.org/10.1097/01.FTD.0000179845.53213.39

Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry*, *78*(3), 779–787. https://doi.org/10.1021/AC051437Y/SUPPL_FILE/AC051437YSI20050810_093207.PDF

Smith, H. L., Freeman, O. J., Butcher, A. J., Holmqvist, S., Humoud, I., Schätzl, T., Hughes, D. T., Verity, N. C., Swinden, D. P., Hayes, J., de Weerd, L., Rowitch, D. H., Franklin, R. J. M., & Mallucci, G. R. (2020). Astrocyte Unfolded Protein Response Induces a Specific Reactivity State that Causes Non-Cell-Autonomous Neuronal Degeneration. *Neuron*, *105*(5), 855-866.e5. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.12.014/ATTACHMENT/95EB5169-28C9-425C-85CB-7A77B4FBFAB7/MMC1.PDF

Smolinska, A., Blanchet, L., Buydens, L. M. C., & Wijmenga, S. S. (2012). NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Analytica Chimica Acta*, *750*, 82–97. https://doi.org/10.1016/J.ACA.2012.05.049

Smyth, G. K., Ritchie, M. E., Law, C. W., Alhamdoosh, M., Su, S., Dong, X., Tian, L., Smyth, G. K., & Ritchie, M. E. (2018). RNA-seq analysis is easy as 1-2-3 with limma, Glimma and edgeR. *F1000Research*, *5*, 1408. https://doi.org/10.12688/f1000research.9005.3

Snowden, S. G., Ebshiana, A. A., Hye, A., An, Y., Pletnikova, O., O'Brien, R., Troncoso, J., Legido-Quigley, C., & Thambisetty, M. (2017). Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. *PLOS Medicine*, *14*(3), e1002266. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1002266

Sochocka, M., Koutsouraki, E., Gasiorowski, K., & Leszek, J. (2013). Vascular Oxidative Stress and Mitochondrial Failure in the Pathobiology of Alzheimer's Disease: A New Approach to Therapy. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, *12*(6), 870–881. https://doi.org/10.2174/18715273113129990072

Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, *32*(12), 638–647. https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002

Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends in Immunology*, *41*(9), 758–770. https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.07.004

Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7–35. https://doi.org/10.1007/S00401-009-0619-8/FIGURES/9

Soltow, Q. A., Strobel, F. H., Mansfield, K. G., Wachtman, L., Park, Y., & Jones, D. P. (2013). High-performance metabolic profiling with dual chromatography-Fourier-transform mass spectrometry (DC-FTMS) for study of the exposome. *Metabolomics*, *9*(SUPPL.1), 132–143. https://doi.org/10.1007/s11306-011-0332-1

Son, S. M., Song, H., Byun, J., Park, K. S., Jang, H. C., Park, Y. J., & Mook-Jung, I. (2012). Accumulation of autophagosomes contributes to enhanced amyloidogenic APP processing under insulin-resistant conditions. *Autophagy*, *8*(12), 1842–1844. https://doi.org/10.4161/auto.21861

Soneson, C., & Delorenzi, M. (2013). A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*, *14*(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-91/TABLES/3

Song, P., An, J., & Zou, M. H. (2020). Immune Clearance of Senescent Cells to Combat Ageing and Chronic Diseases. *Cells 2020, Vol. 9, Page 671*, *9*(3), 671. https://doi.org/10.3390/CELLS9030671

Song, Z., Yang, Y., Wu, Y., Zheng, M., Sun, D., Li, H., & Chen, L. (2022). Glutamic oxaloacetic transaminase 1 as a potential target in human cancer. *European Journal of Pharmacology*, *917*, 174754. https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2022.174754

Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M. A., Goldstein, L. E., Duong, S., Tanzi, R. E., & Moir, R. D. (2010). The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid β-Protein Is an Antimicrobial Peptide. *PLOS ONE*, *5*(3), e9505. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0009505

Soto-Gamez, A., Quax, W. J., & Demaria, M. (2019). Regulation of Survival Networks in Senescent Cells: From Mechanisms to Interventions. *Journal of Molecular Biology*, *431*(15), 2629–2643. https://doi.org/10.1016/J.JMB.2019.05.036

Soucek, T., Cumming, R., Dargusch, R., Maher, P., & Schubert, D. (2003). The Regulation of Glucose Metabolism by HIF-1

Mediates a Neuroprotective Response to Amyloid Beta Peptide. *Neuron*, *39*(1), 43–56. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00367-2

Sparks, D. L., Kuo, Y. M., Roher, A., Martin, T., & Lukas, R. J. (2000). Alterations of Alzheimer's Disease in the Cholesterol-fed Rabbit, Including Vascular Inflammation: Preliminary Observations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *903*(1), 335–344. https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2000.TB06384.X

Spencer, J. P. E. E. (2007). *The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways*. *2*(3), 257–273. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18850181

Spencer, J. P. E., Rice-Evans, C., & Williams, R. J. (2003). Modulation of Pro-survival Akt/Protein Kinase B and ERK1/2 Signaling Cascades by Quercetin and Its in Vivo Metabolites Underlie Their Action on Neuronal Viability *. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(37), 34783–34793. https://doi.org/10.1074/JBC.M305063200

Sperling, R., Mormino, E., & Johnson, K. (2014). The evolution of preclinical Alzheimer's disease: Implications for prevention trials. *Neuron*, *84*(3), 608. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2014.10.038

Spicer, R., Salek, R. M., Moreno, P., Cañueto, D., & Steinbeck, C. (2017). Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. *Metabolomics 2017 13:9*, *13*(9), 1–16. https://doi.org/10.1007/S11306-017-1242-7

Sprenkle, N. T., Sims, S. G., Sánchez, C. L., & Meares, G. P. (2017). Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular Neurodegeneration 2017 12:1*, *12*(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/S13024-017-0183-Y

Stacklies, W., Redestig, H., Scholz, M., Walther, D., & Selbig, J. (2007). pcaMethods—a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data. *Bioinformatics*, *23*(9), 1164–1167. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTM069

Steeland, S., Gorlé, N., Vandendriessche, C., Balusu, S., Brkic, M., Cauwenberghe, C. Van, Imschoot, G. Van, Wonterghem, E. Van, Rycke, R. De, Kremer, A., Lippens, S., Stopa, E., Johanson, C. E., Libert, C., & Vandenbroucke, R. E. (2018). Counteracting the effects of TNF receptor-1 has therapeutic potential in Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, *10*(4), e8300. https://doi.org/10.15252/EMMM.201708300

Stekhoven, D. J., & Bühlmann, P. (2012). MissForest—non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinformatics*, *28*(1), 112–118. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR597

Stenovec, M., Trkov, S., Lasič, E., Terzieva, S., Kreft, M., Rodríguez Arellano, J. J., Parpura, V., Verkhratsky, A., & Zorec, R. (2016). Expression of familial Alzheimer disease presenilin 1 gene attenuates vesicle traffic and reduces peptide secretion in cultured astrocytes devoid of pathologic tissue environment. *Glia*, *64*(2), 317–329. https://doi.org/10.1002/GLIA.22931

Sterling, J. K., Adetunji, M. O., Guttha, S., Bargoud, A. R., Uyhazi, K. E., Ross, A. G., Dunaief, J. L., & Cui, Q. N. (2020). GLP-1 Receptor Agonist NLY01 Reduces Retinal Inflammation and Neuron Death Secondary to Ocular Hypertension. *Cell Reports*, *33*(5). https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.108271

Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., Micheva, K. D., Mehalow, A. K., Huberman, A. D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A. M. M., Lambris, J. D., Smith, S. J., John, S. W. M., & Barres, B. A. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, *131*(6), 1164–1178. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.10.036

Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N. M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., & Ralser, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, *90*(3), 927–963. https://doi.org/10.1111/BRV.12140

Strang, K. H., Golde, T. E., & Giasson, B. I. (2019). MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration. *Laboratory Investigation 2019 99:7*, *99*(7), 912–928. https://doi.org/10.1038/s41374-019-0197-x

Sturm, M., Schroeder, C., & Bauer, P. (2016). SeqPurge: Highly-sensitive adapter trimming for paired-end NGS data. *BMC Bioinformatics*, *17*(1). https://doi.org/10.1186/s12859-016-1069-7

Stutzmann, G. E. (2007). The pathogenesis of Alzheimers disease is it a lifelong "calciumopathy"? *The Neuroscientist : A*

Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry, *13*(5), 546–559. https://doi.org/10.1177/1073858407299730

Subedi, L., Gaire, B. P., Parveen, A., & Kim, S. Y. (2021). Nitric Oxide as a Target for Phytochemicals in Anti-Neuroinflammatory Prevention Therapy. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 4771*, *22*(9), 4771. https://doi.org/10.3390/IJMS22094771

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(43), 15545–15550. https://doi.org/10.1073/PNAS.0506580102/SUPPL_FILE/06580FIG7.JPG

Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Azam, K., Vadivelu, I., Burant, C., Edison, A., Fiehn, O., Higashi, R., Nair, K. S., Sumner, S., & Subramaniam, S. (2016). Metabolomics Workbench: An international repository for metabolomics data and metadata, metabolite standards, protocols, tutorials and training, and analysis tools. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D463-70. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1042

Sultan, M., Schulz, M. H., Richard, H., Magen, A., Klingenhoff, A., Scherf, M., Seifert, M., Borodina, T., Soldatov, A., Parkhomchuk, D., Schmidt, D., O'Keeffe, S., Haas, S., Vingron, M., Lehrach, H., & Yaspo, M. L. (2008). A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science*, *321*(5891), 956–960. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1160342/SUPPL_FILE/1160342S_TABLESS2-S9.ZIP

Sumner, L. W., Alexander, A. E., Ae, A., Ae, D. B., Ae, M. H. B., Beger, R., Daykin, C. A., Teresa, A. E., Fan, W.-M., Oliver, A. E., Ae, F., Goodacre, R., Julian, A. E., Griffin, L., Thomas, A. E., Ae, H., Hardy, N., James, A. E., Ae, H., … Goodacre, R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics 2007 3:3*, *3*(3), 211–221. https://doi.org/10.1007/S11306-007-0082-2

Sun, L., Xu, Y.-W., Han, J., Liang, H., Wang, N., Cheng, Y., L, S., YW, X., J, H., H, L., N, W., & Y, C. (2015). *12/15-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid activate PPARγ: a possible neuroprotective effect in ischemic brain*. *56*(3), 502–514. https://doi.org/10.1194/JLR.M053058

Sun, X., Shih, A. Y., Johannssen, H. C., Erb, H., Li, P., & Murphy, T. H. (2006). Two-photon Imaging of Glutathione Levels in Intact Brain Indicates Enhanced Redox Buffering in Developing Neurons and Cells at the Cerebrospinal Fluid and Blood-Brain Interface *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(25), 17420–17431. https://doi.org/10.1074/JBC.M601567200

Swanson, C. J., Zhang, Y., Dhadda, S., Wang, J., Kaplow, J., Lai, R. Y. K., Lannfelt, L., Bradley, H., Rabe, M., Koyama, A., Reyderman, L., Berry, D. A., Berry, S., Gordon, R., Kramer, L. D., & Cummings, J. L. (2021). A randomized, double-blind, phase 2b proof-of-concept clinical trial in early Alzheimer's disease with lecanemab, an anti-Aβ protofibril antibody. *Alzheimer's Research and Therapy*, *13*(1), 80. https://doi.org/10.1186/s13195-021-00813-8

Sze, C. I., Troncoso, J. C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D. L., & Martin, L. J. (1997). Loss of the Presynaptic Vesicle Protein Synaptophysin in Hippocampus Correlates with Cognitive Decline in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *56*(8), 933–944. https://doi.org/10.1097/00005072-199708000-00011

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D607–D613. https://doi.org/10.1093/nar/gky1131

Takeda, S., Sato, N., Uchio-Yamada, K., Sawada, K., Kunieda, T., Takeuchi, D., Kurinami, H., Shinohara, M., Rakugi, H., & Morishita, R. (2010). *Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Aβ deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes*. *107*(15), 7036–7041. https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1000645107

Talbot, K., Wang, H. Y., Kazi, H., Han, L. Y., Bakshi, K. P., Stucky, A., Fuino, R. L., Kawaguchi, K. R., Samoyedny, A. J., Wilson, R. S., Arvanitakis, Z., Schneider, J. A., Wolf, B. A., Bennett, D. A., Trojanowski, J. Q., & Arnold, S. E. (2012). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(4), 1316–1338. https://doi.org/10.1172/JCI59903

Taniguchi, S., Suzuki, N., Masuda, M., Hisanaga, S. I., Iwatsubo, T., Goedert, M., & Hasegawa, M. (2005). Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *The Journal of Biological*

Chemistry, *280*(9), 7614–7623. https://doi.org/10.1074/JBC.M408714200

Tao, J., Yin, L., Wu, A., Zhang, J., Zhang, J., Shi, H., Liu, S., Niu, L., Xu, L., Feng, Y., Lian, S., Li, L., Zeng, L., Meng, X., Zhou, X., Liu, T., & Zhang, L. (2022). PDIA2 Bridges Endoplasmic Reticulum Stress and Metabolic Reprogramming During Malignant Transformation of Chronic Colitis. *Frontiers in Oncology*, *12*. https://doi.org/10.3389/FONC.2022.836087

Tarca, A. L., Draghici, S., Khatri, P., Hassan, S. S., Mittal, P., Kim, J. S., Kim, C. J., Kusanovic, J. P., & Romero, R. (2009). A novel signaling pathway impact analysis. *Bioinformatics*, *25*(1), 75–82. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTN577

Tataranni, T., & Piccoli, C. (2019). Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*. https://doi.org/10.1155/2019/8201079

Tatsumi, K., Isonishi, A., Yamasaki, M., Kawabe, Y., Morita-Takemura, S., Nakahara, K., Terada, Y., Shinjo, T., Okuda, H., Tanaka, T., & Wanaka, A. (2018). Olig2-Lineage astrocytes: A distinct subtype of astrocytes that differs from GFAP astrocytes. *Frontiers in Neuroanatomy*, *12*(8), 8. https://doi.org/10.3389/FNANA.2018.00008/BIBTEX

Tautenhahn, R., Bottcher, C., & Neumann, S. (2008). Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics*, *9*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-504/FIGURES/10

Tcw, J., & Goate, A. M. (2017). Genetics of β-Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(6), a024539. https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A024539

Tebar, F., Bohlander, S. K., & Sorkin, A. (1999). Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: Localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Molecular Biology of the Cell*, *10*(8), 2687–2702. https://doi.org/10.1091/MBC.10.8.2687/ASSET/IMAGES/LARGE/MK0890936010.JPEG

Tefera, T. W., & Borges, K. (2018). Neuronal glucose metabolism is impaired while astrocytic TCA cycling is unaffected at symptomatic stages in the hSOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: *Https://Doi.Org/10.1177/0271678X18764775*, *39*(9), 1710–1724. https://doi.org/10.1177/0271678X18764775

Tejera, D., Mercan, D., Sanchez-Caro, J. M., Hanan, M., Greenberg, D., Soreq, H., Latz, E., Golenbock, D., & Heneka, M. T. (2019). Systemic inflammation impairs microglial Aβ clearance through NLRP3 inflammasome. *The EMBO Journal*, *38*(17), e101064. https://doi.org/10.15252/EMBJ.2018101064

Teng, M. W. L., Bowman, E. P., McElwee, J. J., Smyth, M. J., Casanova, J. L., Cooper, A. M., & Cua, D. J. (2015). IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nature Medicine 2015 21:7*, *21*(7), 719–729. https://doi.org/10.1038/nm.3895

Teramoto, S., Miyamoto, N., Yatomi, K., Tanaka, Y., Oishi, H., Arai, H., Hattori, N., & Urabe, T. (2011). Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, provides neuroprotection in mice transient focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *31*(8), 1696–1705. https://doi.org/10.1038/JCBFM.2011.51

Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., & Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, *30*(4), 572–580. https://doi.org/10.1002/ANA.410300410

Thal, D. R., Schultz, C., Dehghani, F., Yamaguchi, H., Braak, H., & Braak, E. (2000). Amyloid β-protein (Aβ)-containing astrocytes are located preferentially near N-terminal-truncated Aβ deposits in the human entorhinal cortex. *Acta Neuropathologica 2000 100:6*, *100*(6), 608–617. https://doi.org/10.1007/S004010000242

The Lancet. (2022). Lecanemab for Alzheimer's disease: tempering hype and hope. *The Lancet*, *400*(10367), 1899. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02480-1

Theodoridis, G. A., Gika, H. G., Want, E. J., & Wilson, I. D. (2012). Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Analytica Chimica Acta*, *711*, 7–16. https://doi.org/10.1016/J.ACA.2011.09.042

Thiele, I., Swainston, N., Fleming, R. M. T., Hoppe, A., Sahoo, S., Aurich, M. K., Haraldsdottir, H., Mo, M. L., Rolfsson, O., Stobbe, M. D., Thorleifsson, S. G., Agren, R., Bölling, C., Bordel, S., Chavali, A. K., Dobson, P., Dunn, W. B., Endler, L.,

Hala, D., … Palsson, B. O. (2013). A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nature Biotechnology 2013 31:5*, *31*(5), 419–425. https://doi.org/10.1038/nbt.2488

Thomas, M. H., & Olivier, J. L. (2016). Arachidonic acid in Alzheimer's disease. *Journal of Neurology & Neuromedicine*, *1*(9), 1–6. www.jneurology.com

Thomas, R., Gohlke, J. M., Stopper, G. F., Parham, F. M., & Portier, C. J. (2009). Choosing the right path: Enhancement of biologically relevant sets of genes or proteins using pathway structure. *Genome Biology*, *10*(4), 1–15. https://doi.org/10.1186/GB-2009-10-4-R44/FIGURES/3

Thomason, L. A. M., Smithson, L. J., Hazrati, L. N., McLaurin, J., & Kawaja, M. D. (2013). Reactive astrocytes associated with plaques in TgCRND8 mouse brain and in human Alzheimer brain express phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA-15). *FEBS Letters*, *587*(15), 2448–2454. https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2013.06.015

Tian, J., Song, T., Wang, H., Wang, W., Zhang, Z., & Yan, R. (2019). Thalidomide alleviates bone cancer pain by down-regulating expressions of NF-κB and GFAP in spinal astrocytes in a mouse model. *Https://Doi.Org/10.1080/00207454.2019.1586687*, *129*(9), 896–903. https://doi.org/10.1080/00207454.2019.1586687

Tillakaratne, N. J. K., Medina-Kauwe, L., & Gibson, K. M. (1995). Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *112*(2), 247–263. https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)00099-2

Tiveron, C., Fasulo, L., Capsoni, S., Malerba, F., Marinelli, S., Paoletti, F., Piccinin, S., Scardigli, R., Amato, G., Brandi, R., Capelli, P., D'Aguanno, S., Florenzano, F., La Regina, F., Lecci, A., Manca, A., Meli, G., Pistillo, L., Berretta, N., … Cattaneo, A. (2013). ProNGF\NGF imbalance triggers learning and memory deficits, neurodegeneration and spontaneous epileptic-like discharges in transgenic mice. *Cell Death & Differentiation 2013 20:8*, *20*(8), 1017–1030. https://doi.org/10.1038/cdd.2013.22

Tohyama, T., Lee, V., Rorke, L., Marvin, M., McKay, R., & Trojanowski, J. (1992). Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*.

Toledo, J. B., Arnold, M., Kastenmüller, G., Chang, R., Baillie, R. A., Han, X., Thambisetty, M., Tenenbaum, J. D., Suhre, K., Thompson, J. W., John-Williams, L. S., MahmoudianDehkordi, S., Rotroff, D. M., Jack, J. R., Motsinger-Reif, A., Risacher, S. L., Blach, C., Lucas, J. E., Massaro, T., … Kaddurah-Daouk, R. (2017). Metabolic network failures in Alzheimer's disease: A biochemical road map. *Alzheimer's & Dementia*, *13*(9), 965–984. https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2017.01.020

Tong, J., Huang, C., Bi, F., Wu, Q., Huang, B., Liu, X., Li, F., Zhou, H., & Xia, X. G. (2013). Expression of ALS-linked TDP-43 mutant in astrocytes causes non-cell-autonomous motor neuron death in rats. *The EMBO Journal*, *32*(13), 1917–1926. https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2013.122

Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology 2010 28:5*, *28*(5), 511–515. https://doi.org/10.1038/nbt.1621

Trias, E., Díaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Isasi, E., Drechsel, D. A., Lopez, N., Bradford, C. S., Ireton, K. E., Beckman, J. S., & Barbeito, L. (2013). Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(DEC). https://doi.org/10.3389/FNCEL.2013.00274

Trias, E., Ibarburu, S., Barreto-Núñez, R., Babdor, J., Maciel, T. T., Guillo, M., Gros, L., Dubreuil, P., Díaz-Amarilla, P., Cassina, P., Martínez-Palma, L., Moura, I. C., Beckman, J. S., Hermine, O., & Barbeito, L. (2016). Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/S12974-016-0620-9/FIGURES/5

Troyanskaya, O., Cantor, M., Sherlock, G., Brown, P., Hastie, T., Tibshirani, R., Botstein, D., & Altman, R. B. (2001). Missing value estimation methods for DNA microarrays. *Bioinformatics*, *17*(6), 520–525. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/17.6.520

Trygg, J., & Wold, S. (2002). Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics*, *16*(3), 119–128.

https://doi.org/10.1002/CEM.695

Tsachaki, M., Mladenovic, N., Štambergové, H., Birk, J., & Odermatt, A. (2018). Hexose-6-phosphate dehydrogenase controls cancer cell proliferation and migration through pleiotropic effects on the unfolded-protein response, calcium homeostasis, and redox balance. *The FASEB Journal*, *32*(5), 2690–2705. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.201700870RR

Tu, D., Gao, Y., Yang, R., Guan, T., Hong, J. S., & Gao, H. M. (2019). The pentose phosphate pathway regulates chronic neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/S12974-019-1659-1/FIGURES/7

Turner, R. S., Hebron, M. L., Lawler, A., Mundel, E. E., Yusuf, N., Starr, J. N., Anjum, M., Pagan, F., Torres-Yaghi, Y., Shi, W., Mulki, S., Ferrante, D., Matar, S., Liu, X., Esposito, G., Berkowitz, F., Jiang, X., Ahn, J., & Moussa, C. (2020). Nilotinib Effects on Safety, Tolerability, and Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Annals of Neurology*, *88*(1), 183–194. https://doi.org/10.1002/ANA.25775

Tweedie, D., Ferguson, R. A., Fishman, K., Frankola, K. A., Van Praag, H., Holloway, H. W., Luo, W., Li, Y., Caracciolo, L., Russo, I., Barlati, S., Ray, B., Lahiri, D. K., Bosetti, F., Greig, N. H., & Rosi, S. (2012). Tumor necrosis factor-α synthesis inhibitor 3,6'-dithiothalidomide attenuates markers of inflammation, Alzheimer pathology and behavioral deficits in animal models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-106/FIGURES/8

Ugalde, C. L., Lewis, V., Stehmann, C., McLean, C. A., Lawson, V. A., Collins, S. J., & Hill, A. F. (2020). Markers of A1 astrocytes stratify to molecular sub-types in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease brain. *Brain Communications*, *2*(2). https://doi.org/10.1093/BRAINCOMMS/FCAA029

Ulianich, L., Mirra, P., Garbi, C., Calì, G., Conza, D., Treglia, A. S., Miraglia, A., Punzi, D., Miele, C., Raciti, G. A., Beguinot, F., Consiglio, E., & Di Jeso, B. (2020). The Pervasive Effects of ER Stress on a Typical Endocrine Cell: Dedifferentiation, Mesenchymal Shift and Antioxidant Response in the Thyrocyte. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 852. https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.588685/BIBTEX

Uppal, K., Ma, C., Go, Y. M., & Jones, D. P. (2018). XMWAS: A data-driven integration and differential network analysis tool. *Bioinformatics*, *34*(4), 701–702. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx656

Uppal, K., Soltow, Q. A., Strobel, F. H., Pittard, W. S., Gernert, K. M., Yu, T., & Jones, D. P. (2013). XMSanalyzer: Automated pipeline for improved feature detection and downstream analysis of large-scale, non-targeted metabolomics data. *BMC Bioinformatics*, *14*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-15

Uppal, K., Walker, D. I., & Jones, D. P. (2017). xMSannotator: An R package for network-based annotation of high-resolution metabolomics data. *Analytical Chemistry*, *89*(2), 1063–1067. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01214

Ursan, I. D., Jiang, R., Pickard, E. M., Lee, T. A., Ng, D., & Pickard, A. S. (2015). Emergence of BCR-ABL Kinase Domain Mutations Associated with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: A Meta-Analysis of Clinical Trials of Tyrosine Kinase Inhibitors. *Https://Doi.Org/10.18553/Jmcsp.2015.21.2.114*, *21*(2), 114–122. https://doi.org/10.18553/JMCSP.2015.21.2.114

Vagelatos, N. T., & Eslick, G. D. (2013). Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Alzheimer's Disease: The Confounders, Interactions, and Neuropathology Associated With This Relationship. *Epidemiologic Reviews*, *35*(1), 152–160. https://doi.org/10.1093/EPIREV/MXS012

Vahabi, N., & Michailidis, G. (2022). Unsupervised Multi-Omics Data Integration Methods: A Comprehensive Review. *Frontiers in Genetics*, *13*, 560. https://doi.org/10.3389/FGENE.2022.854752/BIBTEX

Välikangas, T., Suomi, T., & Elo, L. L. (2018). A systematic evaluation of normalization methods in quantitative label-free proteomics. *Briefings in Bioinformatics*, *19*(1), 1–11. https://doi.org/10.1093/BIB/BBW095

Valvona, C. J., Fillmore, H. L., Nunn, P. B., & Pilkington, G. J. (2016). The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *26*(1), 3–17. https://doi.org/10.1111/BPA.12299

Van Cauwenberghe, C., Vandendriessche, C., Libert, C., & Vandenbroucke, R. E. (2016). Caloric restriction: beneficial effects

on brain aging and Alzheimer's disease. *Mammalian Genome 2016 27:7*, *27*(7), 300–319. https://doi.org/10.1007/S00335-016-9647-6

van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, *7*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142/FIGURES/9

van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., Kanekiyo, M., Li, D., Reyderman, L., Cohen, S., Froelich, L., Katayama, S., Sabbagh, M., Vellas, B., Watson, D., Dhadda, S., Irizarry, M., Kramer, L. D., & Iwatsubo, T. (2022). Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948

Van Velzen, E. J. J., Westerhuis, J. A., Van Duynhoven, J. P. M., Van Dorsten, F. A., Hoefsloot, H. C. J., Jacobs, D. M., Smit, S., Draijer, R., Kroner, C. I., & Smilde, A. K. (2008). Multilevel data analysis of a crossover designed human nutritional intervention study. *Journal of Proteome Research*, *7*(10), 4483–4491. https://doi.org/10.1021/PR800145J/SUPPL_FILE/PR800145J_SI_002.PDF

Vanmierlo, T., Bloks, V. W., Van Vark-Van Der Zee, L. C., Rutten, K., Kerksiek, A., Friedrichs, S., Sijbrands, E., Steinbusch, H. W., Kuipers, F., Lütjohann, D., & Mulder, M. (2010). Alterations in Brain Cholesterol Metabolism in the APPSLxPS1mut mouse, a Model for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *19*(1), 117–127. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1209

Varcianna, A., Myszczynska, M. A., Castelli, L. M., O'Neill, B., Kim, Y., Talbot, J., Nyberg, S., Nyamali, I., Heath, P. R., Stopford, M. J., Hautbergue, G. M., & Ferraiuolo, L. (2019). Micro-RNAs secreted through astrocyte-derived extracellular vesicles cause neuronal network degeneration in C9orf72 ALS. *EBioMedicine*, *40*, 626–635. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.067

Vardjan, N., Parpura, V., Verkhratsky, A., & Zorec, R. (2019). Gliocrine system: Astroglia as secretory cells of the CNS. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1175*, 93–115. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_4/COVER

Vargas, M. R., Pehar, M., Cassina, P., Beckman, J. S., & Barbeito, L. (2006). Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, *97*(3), 687–696. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.03742.X

Varghese, R. S., Zhou, B., Nezami Ranjbar, M. R., Zhao, Y., & Ressom, H. W. (2012). Ion annotation-assisted analysis of LC-MS based metabolomic experiment. *Proteome Science*, *10*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/1477-5956-10-S1-S8/TABLES/6

Varma, V. R., Oommen, A. M., Varma, S., Casanova, R., An, Y., Andrews, R. M., O'Brien, R., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Toledo, J., Baillie, R., Arnold, M., Kastenmueller, G., Nho, K., Doraiswamy, P. M., Saykin, A. J., Kaddurah-Daouk, R., Legido-Quigley, C., & Thambisetty, M. (2018). Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: A targeted metabolomics study. *PLOS Medicine*, *15*(1), e1002482. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1002482

Vekrellis, K., Ye, Z., Qiu, W. Q., Walsh, D., Hartley, D., Chesneau, V., Rosner, M. R., & Selkoe, D. J. (2000). Neurons Regulate Extracellular Levels of Amyloid β-Protein via Proteolysis by Insulin-Degrading Enzyme. *Journal of Neuroscience*, *20*(5), 1657–1665. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-05-01657.2000

Verkhratsky, A., Matteoli, M., Parpura, V., Mothet, J., & Zorec, R. (2016). Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *The EMBO Journal*, *35*(3), 239–257. https://doi.org/10.15252/EMBJ.201592705

Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2017). Physiology of Astroglia. *Https://Doi.Org/10.1152/Physrev.00042.2016*, *98*(1), 239–389. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00042.2016

Veronica Witte, A., Kerti, L., Margulies, D. S., & Flöel, A. (2014). Effects of Resveratrol on Memory Performance, Hippocampal Functional Connectivity, and Glucose Metabolism in Healthy Older Adults. *Journal of Neuroscience*, *34*(23), 7862–7870. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0385-14.2014

Vetrivel, K. S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., Wong, P. C., Xu, H., & Thinakaran, G. (2004). Association of γ-Secretase with Lipid Rafts in Post-Golgi and Endosome Membranes *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(43),

44945–44954. https://doi.org/10.1074/JBC.M407986200

Viejo, L., Noori, A., Merrill, E., Das, S., Hyman, B. T., & Serrano-Pozo, A. (2021). Systematic review of human post-mortem immunohistochemical studies and bioinformatics analyses unveil the complexity of astrocyte reaction in Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. https://doi.org/10.1111/NAN.12753

Villarreal, A., Rosciszewski, G., Murta, V., Cadena, V., Usach, V., Dodes-Traian, M. M., Setton-Avruj, P., Barbeito, L. H., & Ramos, A. J. (2016). *Isolation and Characterization of Ischemia-Derived Astrocytes (IDAs) with Ability to Transactivate Quiescent Astrocytes*. *JUN*, 139. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2016.00139

Villarreal, A., Vidos, C., Monteverde Busso, M., Cieri, M. B., & Ramos, A. J. (2021). Pathological Neuroinflammatory Conversion of Reactive Astrocytes Is Induced by Microglia and Involves Chromatin Remodeling. *Frontiers in Pharmacology*, *12*. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.689346

Villavicencio Tejo, F., & Quintanilla, R. A. (2021). Contribution of the Nrf2 Pathway on Oxidative Damage and Mitochondrial Failure in Parkinson and Alzheimer's Disease. *Antioxidants 2021, Vol. 10, Page 1069*, *10*(7), 1069. https://doi.org/10.3390/ANTIOX10071069

Villemagne, V. L., Pike, K. E., Chételat, G., Ellis, K. A., Mulligan, R. S., Bourgeat, P., Ackermann, U., Jones, G., Szoeke, C., Salvado, O., Martins, R., O'Keefe, G., Mathis, C. A., Klunk, W. E., Ames, D., Masters, C. L., & Rowe, C. C. (2011). Longitudinal assessment of Aβ and cognition in aging and Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, *69*(1), 181–192. https://doi.org/10.1002/ANA.22248

Vinaixa, M., Samino, S., Saez, I., Duran, J., Guinovart, J. J., & Yanes, O. (2012). A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites*, *2*(4), 775. https://doi.org/10.3390/METABO2040775

Vlad, S. C., Miller, D. R., Kowall, N. W., & Felson, D. T. (2008). Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*, *70*(19), 1672–1677. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000311269.57716.63

Vom Berg, J., Prokop, S., Miller, K. R., Obst, J., Kälin, R. E., Lopategui-Cabezas, I., Wegner, A., Mair, F., Schipke, C. G., Peters, O., Winter, Y., Becher, B., & Heppner, F. L. (2012). Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease–like pathology and cognitive decline. *Nature Medicine 2012 18:12*, *18*(12), 1812–1819. https://doi.org/10.1038/nm.2965

Vulevic, J., Drakoularakou, A., Yaqoob, P., Tzortzis, G., & Gibson, G. R. (2008). Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *88*(5), 1438–1446. https://doi.org/10.3945/AJCN.2008.26242

Waagepetersen, H. S., Sonnewald, U., & Schousboe, A. (2009). Energy and Amino Acid Neurotransmitter Metabolism in Astrocytes. *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System*, *9780387794921*, 177–200. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79492-1_7

Wagner, G. P., Kin, K., & Lynch, V. J. (2012). Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory in Biosciences 2012 131:4*, *131*(4), 281–285. https://doi.org/10.1007/S12064-012-0162-3

Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A. C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Younkin, S. G., & Golde, T. E. (2002). Cholesterol-Dependent γ-Secretase Activity in Buoyant Cholesterol-Rich Membrane Microdomains. *Neurobiology of Disease*, *9*(1), 11–23. https://doi.org/10.1006/NBDI.2001.0470

Wahrle, S. E., Jiang, H., Parsadanian, M., Kim, J., Li, A., Knoten, A., Jain, S., Hirsch-Reinshagen, V., Wellington, C. L., Bales, K. R., Paul, S. M., & Holtzman, D. M. (2008). Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(2), 671–682. https://doi.org/10.1172/JCI33622

Wahrle, S. E., Jiang, H., Parsadanian, M., Legleiter, J., Han, X., Fryer, J. D., Kowalewski, T., & Holtzman, D. M. (2004). ABCA1 Is Required for Normal Central Nervous System ApoE Levels and for Lipidation of Astrocyte-secreted apoE *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(39), 40987–40993. https://doi.org/10.1074/JBC.M407963200

Walls, A. B., Waagepetersen, H. S., Bak, L. K., Schousboe, A., & Sonnewald, U. (2014). The Glutamine–Glutamate/GABA Cycle: Function, Regional Differences in Glutamate and GABA Production and Effects of Interference with GABA

Metabolism. *Neurochemical Research 2014 40:2*, *40*(2), 402–409. https://doi.org/10.1007/S11064-014-1473-1

Walton, C. C., Begelman, D., Nguyen, W., & Andersen, J. K. (2020). Senescence as an Amyloid Cascade: The Amyloid Senescence Hypothesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 129. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.00129/BIBTEX

Wang-Sattler, R., Yu, Z., Herder, C., Messias, A. C., Floegel, A., He, Y., Heim, K., Campillos, M., Holzapfel, C., Thorand, B., Grallert, H., Xu, T., Bader, E., Huth, C., Mittelstrass, K., Döring, A., Meisinger, C., Gieger, C., Prehn, C., … Illig, T. (2012). Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. *Molecular Systems Biology*, *8*(1), 615. https://doi.org/10.1038/MSB.2012.43

Wang, C., Sun, B., Zhou, Y., Grubb, A., & Gan, L. (2012). Cathepsin B Degrades Amyloid-β in Mice Expressing Wild-type Human Amyloid Precursor Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(47), 39834. https://doi.org/10.1074/JBC.M112.371641

Wang, D., Cheng, L., Wang, M., Wu, R., Li, P., Li, B., Zhang, Y., Gu, Y., Zhao, W., Wang, C., & Guo, Z. (2011). Extensive increase of microarray signals in cancers calls for novel normalization assumptions. *Computational Biology and Chemistry*, *35*(3), 126–130. https://doi.org/10.1016/J.COMPBIOLCHEM.2011.04.006

Wang, D., Wei, Y., Schmoll, D., Maclean, K. N., & Pagliassotti, M. J. (2006). Endoplasmic Reticulum Stress Increases Glucose-6-Phosphatase and Glucose Cycling in Liver Cells. *Endocrinology*, *147*(1), 350–358. https://doi.org/10.1210/EN.2005-1014

Wang, H. Y., Lee, D. H. S., Davis, C. B., & Shank, R. P. (2000). Amyloid Peptide Aβ1-42 Binds Selectively and with Picomolar Affinity to α7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal of Neurochemistry*, *75*(3), 1155–1161. https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2000.0751155.X

Wang, H. Y., Li, W., Benedetti, N. J., & Lee, D. H. S. (2003). α7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Mediate β-Amyloid Peptide-induced Tau Protein Phosphorylation *. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(34), 31547–31553. https://doi.org/10.1074/JBC.M212532200

Wang, J. H., Byun, J., & Pennathur, S. (2010). Analytical approaches to metabolomics and applications to systems biology. *Seminars in Nephrology*, *30*(5), 500–511. https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.07.007

Wang, Wei, Bu, B., Xie, M., Zhang, M., Yu, Z., & Tao, D. (2009). Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Progress in Neurobiology*, *89*(1), 1–17. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2009.01.007

Wang, Wenzhang, Zhao, F., Ma, X., Perry, G., & Zhu, X. (2020). Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances. *Molecular Neurodegeneration 2020 15:1*, *15*(1), 1–22. https://doi.org/10.1186/S13024-020-00376-6

Wang, X., Sun, Q., McGrath, S. D., Mardis, E. R., Soloway, P. D., & Clark, A. G. (2008). Transcriptome-Wide Identification of Novel Imprinted Genes in Neonatal Mouse Brain. *PLOS ONE*, *3*(12), e3839. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0003839

Wang, Y. W., He, S. J., Feng, X., Cheng, J., Luo, Y. T., Tian, L., & Huang, Q. (2017). Metformin: a review of its potential indications. *Drug Design, Development and Therapy*, *11*, 2421–2429. https://doi.org/10.2147/DDDT.S141675

Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics 2008 10:1*, *10*(1), 57–63. https://doi.org/10.1038/nrg2484

Wang, Z. H., Peng, W. B., Zhang, P., Yang, X. P., & Zhou, Q. (2021). Lactate in the tumour microenvironment: From immune modulation to therapy. *EBioMedicine*, *73*. https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2021.103627

Wang, Z. J., Liang, C. L., Li, G. M., Yu, C. Y., Yin, M., ZJ, W., CL, L., GM, L., CY, Y., & M, Y. (2006). *Neuroprotective effects of arachidonic acid against oxidative stress on rat hippocampal slices*. *163*(3), 207–217. https://doi.org/10.1016/J.CBI.2006.08.005

Wanichthanarak, K., Fahrmann, J. F., & Grapov, D. (2015). Genomic, Proteomic, and Metabolomic Data Integration Strategies. *Biomarker Insights*, *10*(Suppl 4), 1–6. https://doi.org/10.4137/BMI.S29511

Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T.,

Kang, D. E., Marquez-Sterling, N., Golde, T. E., & Koo, E. H. (2001). A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Aβ42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature 2001 414:6860*, *414*(6860), 212–216. https://doi.org/10.1038/35102591

Weichhart, T. (2018). mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology*, *64*(2), 127–134. https://doi.org/10.1159/000484629

Wengerodt, D., Schmeer, C., Witte, O. W., & Kretz, A. (2019). Amitosenescence and Pseudomitosenescence: Putative New Players in the Aging Process. *Cells 2019, Vol. 8, Page 1546*, *8*(12), 1546. https://doi.org/10.3390/CELLS8121546

Wetmore, D. R., Joseloff, E., Pilewski, J., Lee, D. P., Lawton, K. A., Mitchell, M. W., Milburn, M. V., Ryals, J. A., & Guo, L. (2010). Metabolomic Profiling Reveals Biochemical Pathways and Biomarkers Associated with Pathogenesis in Cystic Fibrosis Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(40), 30516–30522. https://doi.org/10.1074/JBC.M110.140806

Wharton, S. B., O'Callaghan, J. P., Savva, G. M., Nicoll, J. A. R., Matthews, F., Simpson, J. E., Forster, G., Shaw, P. J., Brayne, C., & Ince, P. G. (2009). Population Variation in Glial Fibrillary Acidic Protein Levels in Brain Ageing: Relationship to Alzheimer-Type Pathology and Dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *27*(5), 465–473. https://doi.org/10.1159/000217729

Wheeler, M. A., Clark, I. C., Tjon, E. C., Li, Z., Zandee, S. E. J., Couturier, C. P., Watson, B. R., Scalisi, G., Alkwai, S., Rothhammer, V., Rotem, A., Heyman, J. A., Thaploo, S., Sanmarco, L. M., Ragoussis, J., Weitz, D. A., Petrecca, K., Moffitt, J. R., Becher, B., … Quintana, F. J. (2020). MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. *Nature 2020 578:7796*, *578*(7796), 593–599. https://doi.org/10.1038/s41586-020-1999-0

Whiley, L., Sen, A., Heaton, J., Proitsi, P., García-Gómez, D., Leung, R., Smith, N., Thambisetty, M., Kloszewska, I., Mecocci, P., Soininen, H., Tsolaki, M., Vellas, B., Lovestone, S., & Legido-Quigley, C. (2014). Evidence of altered phosphatidylcholine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *35*(2), 271–278. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2013.08.001

Wilcock, D. M., Vitek, M. P., & Colton, C. A. (2009). Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *159*(3), 1055–1069. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.01.023

Wilcock, Donna M., & Colton, C. A. (2008). Anti-Amyloid-β Immunotherapy in Alzheimer's Disease: Relevance of Transgenic Mouse Studies to Clinical Trials. *Journal of Alzheimer's Disease*, *15*(4), 555–569. https://doi.org/10.3233/JAD-2008-15404

Wilcock, Donna M., Gharkholonarehe, N., Van Nostrand, W. E., Davis, J., Vitek, M. P., & Colton, C. A. (2009). Amyloid Reduction by Amyloid-β Vaccination Also Reduces Mouse Tau Pathology and Protects from Neuron Loss in Two Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, *29*(25), 7957–7965. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1339-09.2009

Wilhelmus, M. M. M., Bol, J. G. J. M., van Duinen, S. G., & Drukarch, B. (2013). Extracellular matrix modulator lysyl oxidase colocalizes with amyloid-beta pathology in Alzheimer's disease and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis—Dutch type. *Experimental Gerontology*, *48*(2), 109–114. https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2012.12.007

Wilkins, J. M., & Trushina, E. (2018). Application of metabolomics in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neurology*, *8*(JAN), 719. https://doi.org/10.3389/FNEUR.2017.00719/BIBTEX

William, C. M., Andermann, M. L., Goldey, G. J., Roumis, D. K., Clay Reid, R., Shatz, C. J., Albers, M. W., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2012). Synaptic Plasticity Defect Following Visual Deprivation in Alzheimer's Disease Model Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience*, *32*(23), 8004–8011. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5369-11.2012

Winkler, E. A., Nishida, Y., Sagare, A. P., Rege, S. V., Bell, R. D., Perlmutter, D., Sengillo, J. D., Hillman, S., Kong, P., Nelson, A. R., Sullivan, J. S., Zhao, Z., Meiselman, H. J., Wenby, R. B., Soto, J., Abel, E. D., Makshanoff, J., Zuniga, E., De Vivo, D. C., & Zlokovic, B. V. (2015). GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nature Neuroscience 2015 18:4*, *18*(4), 521–530. https://doi.org/10.1038/nn.3966

Wishart, D., Arndt, D., Pon, A., Sajed, T., Guo, A. C., Djoumbou, Y., Knox, C., Wilson, M., Liang, Y., Grant, J., Liu, Y., Goldansaz, S. A., & Rappaport, S. M. (2015). T3DB: the toxic exposome database. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D928–D934. https://doi.org/10.1093/NAR/GKU1004

Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorndahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., … Scalbert, A. (2013). HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1). https://doi.org/10.1093/nar/gks1065

Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D. D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S., Mandal, R., Sinelnikov, I., Xia, J., Jia, L., Cruz, J. A., Lim, E., Sobsey, C. A., Shrivastava, S., Huang, P., … Forsythei, I. (2009). HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research*, *37*(suppl_1), D603–D610. https://doi.org/10.1093/NAR/GKN810

Witcher, K. G., Eiferman, D. S., & Godbout, J. P. (2015). Priming the Inflammatory Pump of the CNS after Traumatic Brain Injury. *Trends in Neurosciences*, *38*(10), 609–620. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2015.08.002

Wolfender, J. L., Marti, G., Thomas, A., & Bertrand, S. (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, *1382*, 136–164. https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2014.10.091

Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G. G., & Siegel, G. (2000). Decreased Prevalence of Alzheimer Disease Associated With 3-Hydroxy-3-Methyglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Archives of Neurology*, *57*(10), 1439–1443. https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.57.10.1439

Wong, R. H. X., Scholey, A., & Howe, P. R. C. (2014). Assessing Premorbid Cognitive Ability in Adults With Type 2 Diabetes Mellitus—a Review With Implications for Future Intervention Studies. *Current Diabetes Reports 2014 14:11*, *14*(11), 1–12. https://doi.org/10.1007/S11892-014-0547-4

Wong, S. Y., & Tang, B. L. (2016). SIRT1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*, *27*(8), 813–825. https://doi.org/10.1515/REVNEURO-2016-0023/XML

Woodling, N. S., Colas, D., Wang, Q., Minhas, P., Panchal, M., Liang, X., Mhatre, S. D., Brown, H., Ko, N., Zagol-Ikapitte, I., Van Der Hart, M., Khroyan, T. V., Chuluun, B., Priyam, P. G., Milne, G. L., Rassoulpour, A., Boutaud, O., Manning-Boğ, A. B., Heller, H. C., & Andreasson, K. I. (2016). Cyclooxygenase inhibition targets neurons to prevent early behavioural decline in Alzheimer's disease model mice. *Brain*, *139*(7), 2063–2081. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWW117

Workman, C., Jensen, L. J., Jarmer, H., Berka, R., Gautier, L., Nielser, H. B., Saxild, H. H., Nielsen, C., Brunak, S., & Knudsen, S. (2002). A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments. *Genome Biology*, *3*(9), 1–16. https://doi.org/10.1186/GB-2002-3-9-RESEARCH0048/FIGURES/12

Wu, D., & Smyth, G. K. (2012). Camera: A competitive gene set test accounting for inter-gene correlation. *Nucleic Acids Research*, *40*(17), e133. https://doi.org/10.1093/nar/gks461

Wu, H., Southam, A. D., Hines, A., & Viant, M. R. (2008). High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Analytical Biochemistry*, *372*(2), 204–212. https://doi.org/10.1016/J.AB.2007.10.002

Wu, M., Ye, H., Shao, C., Zheng, X., Li, Q., Wang, L., Zhao, M., Lu, G., Chen, B., Zhang, J., Wang, Y., Wang, G., & Hao, H. (2017). *Metabolomics–Proteomics Combined Approach Identifies Differential Metabolism-Associated Molecular Events between Senescence and Apoptosis*. https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.7B00111

Wu, Z., Guo, Z., Gearing, M., & Chen, G. (2014). Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzhiemer' s disease model. *Nature Communications*, *5*. https://doi.org/10.1038/ncomms5159

Wyss-Coray, T., Loike, J. D., Brionne, T. C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S. C., & Husemann, J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-β in vitro and in situ. *Nature Medicine 2003 9:4*, *9*(4), 453–457. https://doi.org/10.1038/nm838

Xia, J., & Wishart, D. S. (2010). MSEA: a web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data. *Nucleic Acids Research*, *38*(suppl_2), W71–W77. https://doi.org/10.1093/NAR/GKQ329

Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Walker, D. G., Lue, L. F., Beach, T. G., Sue, L. I., Woulfe, J., Xu, H., Stanimirovic, D. B., & Zhang, W. (2008). Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high β- and γ-secretase activities and Aβ production. *Neurobiology of Disease*, *29*(3), 422–437. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2007.10.005

Xu, X., Zhang, A., Zhu, Y., He, W., Di, W., Fang, Y., & Shi, X. (2019). MFG-E8 reverses microglial-induced neurotoxic astrocyte

(A1) via NF-κB and PI3K-Akt pathways. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(1), 904–914. https://doi.org/10.1002/JCP.26918

Xu, Y. F., Lu, W., & Rabinowitz, J. D. (2015). Avoiding misannotation of in-source fragmentation products as cellular metabolites in liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics. *Analytical Chemistry*, *87*(4), 2273–2281. https://doi.org/10.1021/AC504118Y/SUPPL_FILE/AC504118Y_SI_001.PDF

Yadav, R. K., Chae, S.-W., Kim, H.-R., Chae, and H. J., Chae, H. J., & Chae, and H. J. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, *19*(2), 75–88. https://doi.org/10.15430/JCP.2014.19.2.75

Yamaguchi, H., Sugihara, S., Ogawa, A., Saido, T. C., & Ihara, Y. (1998). Diffuse plaques associated with astroglial amyloid β protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathologica 1998 95:3*, *95*(3), 217–222. https://doi.org/10.1007/S004010050790

Yamamoto, M., Kiyota, T., Horiba, M., Buescher, J. L., Walsh, S. M., Gendelman, H. E., & Ikezu, T. (2007). Interferon-γ and Tumor Necrosis Factor-α Regulate Amyloid-β Plaque Deposition and β-Secretase Expression in Swedish Mutant APP Transgenic Mice. *The American Journal of Pathology*, *170*(2), 680–692. https://doi.org/10.2353/AJPATH.2007.060378

Yamanaka, K., Chun, S. J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D. H., Takahashi, R., Misawa, H., & Cleveland, D. W. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, *11*(3), 251–253. https://doi.org/10.1038/NN2047

Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T. R., Liu, C. C., & Bu, G. (2019). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nature Reviews Neurology 2019 15:9*, *15*(9), 501–518. https://doi.org/10.1038/s41582-019-0228-7

Yan, Q., Zhang, J., Liu, H., Babu-Khan, S., Vassar, R., Biere, A. L., Citron, M., & Landreth, G. (2003). Anti-Inflammatory Drug Therapy Alters β-Amyloid Processing and Deposition in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, *23*(20), 7504–7509. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-20-07504.2003

Yang, F., Lim, G. P., Begum, A. N., Ubeda, O. J., Simmons, M. R., Ambegaokar, S. S., Chen, P., Kayed, R., Glabe, C. G., Frautschy, S. A., & Cole, G. M. (2005). Curcumin Inhibits Formation of Amyloid β Oligomers and Fibrils, Binds Plaques, and Reduces Amyloid in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(7), 5892–5901. https://doi.org/10.1074/JBC.M404751200

Yang, H. C., Wu, Y. H., Yen, W. C., Liu, H. Y., Hwang, T. L., Stern, A., & Chiu, D. T. Y. (2019). The Redox Role of G6PD in Cell Growth, Cell Death, and Cancer. *Cells 2019, Vol. 8, Page 1055*, *8*(9), 1055. https://doi.org/10.3390/CELLS8091055

Yang, Q., Wang, E. Y., Huang, X. J., Qu, W. S., Zhang, L., Xu, J. Z., Wang, W., & Tian, D. S. (2011). Blocking epidermal growth factor receptor attenuates reactive astrogliosis through inhibiting cell cycle progression and protects against ischemic brain injury in rats. *Journal of Neurochemistry*, *119*(3), 644–653. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07446.X

Yang, Y., Gozen, O., Watkins, A., Lorenzini, I., Lepore, A., Gao, Y., Vidensky, S., Brennan, J., Poulsen, D., Won Park, J., Li Jeon, N., Robinson, M. B., & Rothstein, J. D. (2009). Presynaptic Regulation of Astroglial Excitatory Neurotransmitter Transporter GLT1. *Neuron*, *61*(6), 880–894. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2009.02.010/ATTACHMENT/3998234C-9C24-4E33-A416-749EAE0162E8/MMC2.AVI

Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D. M., Peng, V., Ngai, J., & Speed, T. P. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Research*, *30*(4), e15–e15. https://doi.org/10.1093/NAR/30.4.E15

Yao, J., Irwin, R. W., Zhao, L., Nilsen, J., Hamilton, R. T., & Brinton, R. D. (2009). Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(34), 14670–14675. https://doi.org/10.1073/PNAS.0903563106

Yao, Z. X., Drieu, K., Szweda, L. I., & Papadopoulos, V. (1999). Free radicals and lipid peroxidation do not mediate beta-amyloid-induced neuronal cell death. *Brain Research*, *847*(2), 203–210. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02047-8

Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (1999). Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Research*, *830*(2), 226–236. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01389-X

Yasuda, Y., Tateishi, N., Shimoda, T., Satoh, S., Ogitani, E., & Fujita, S. (2004). Relationship between S100β and GFAP expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after mild transient ischemia. *Brain Research*, *1021*(1), 20–31. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2004.06.015

Yeh, C. W., Yeh, S. H. H., Shie, F. S., Lai, W. S., Liu, H. K., Tzeng, T. T., Tsay, H. J., & Shiao, Y. J. (2015). Impaired cognition and cerebral glucose regulation are associated with astrocyte activation in the parenchyma of metabolically stressed APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiology of Aging*, *36*(11), 2984–2994. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2015.07.022

Yeh, C. Y., Vadhwana, B., Verkhratsky, A., & Rodríguez, J. J. (2011). Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *ASN Neuro*, *3*(5), 271–279. https://doi.org/10.1042/AN20110025

Yi, C., Mei, X., Ezan, P., Mato, S., Matias, I., Giaume, C., & Koulakoff, A. (2016). Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death and Differentiation*, *23*(10), 1691. https://doi.org/10.1038/CDD.2016.63

Yi, W., Clark, P. M., Mason, D. E., Keenan, M. C., Hill, C., Goddard, W. A., Peters, E. C., Driggers, E. M., & Hsieh-Wilson, L. C. (2012). Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science*, *337*(6097), 975–980. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1222278/SUPPL_FILE/YI.W.SM.PDF

Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G. (2020). Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *Journal of Central Nervous System Disease*, *12*, 1179573520907397. https://doi.org/10.1177/1179573520907397

Yoon, S. J., Elahi, L. S., Paşca, A. M., Marton, R. M., Gordon, A., Revah, O., Miura, Y., Walczak, E. M., Holdgate, G. M., Fan, H. C., Huguenard, J. R., Geschwind, D. H., & Paşca, S. P. (2019). Reliability of human cortical organoid generation. *Nature Methods*, *16*(1), 75–78. https://doi.org/10.1038/S41592-018-0255-0

Yoshioka, N., Asou, H., Hisanaga, S. I., & Kawano, H. (2012). The astrocytic lineage marker calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1 (Camsap1): Phenotypic heterogeneity of newly born Camsap1-expressing cells in injured mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, *520*(6), 1301–1317. https://doi.org/10.1002/CNE.22788

You, X., Jiang, W., Lu, W., Zhang, H., Yu, T., Tian, J., Wen, S., Garcia-Manero, G., Huang, P., & Hu, Y. (2019). Metabolic reprogramming and redox adaptation in sorafenib-resistant leukemia cells: Detected by untargeted metabolomics and stable isotope tracing analysis. *Cancer Communications*, *39*(1). https://doi.org/10.1186/s40880-019-0362-z

Youdim, M. B. H., & Weinstock, M. (2004). Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. *Neurotoxicology*, *25*(1–2), 243–250. https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00103-7

Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., & Oshlack, A. (2010). *Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias*. *11*(2). https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2010-11-2-r14

Yousefi, P., Huen, K., Schall, R. A., Decker, A., Elboudwarej, E., Quach, H., Barcellos, L., & Holland, N. (2013). Considerations for normalization of DNA methylation data by Illumina 450K BeadChip assay in population studies. *Http://Dx.Doi.Org/10.4161/Epi.26037*, *8*(11), 1141–1152. https://doi.org/10.4161/EPI.26037

Yousefzadeh, M. J., Zhu, Y., McGowan, S. J., Angelini, L., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Xu, M., Ling, Y. Y., Melos, K. I., Pirtskhalava, T., Inman, C. L., McGuckian, C., Wade, E. A., Kato, J. I., Grassi, D., Wentworth, M., Burd, C. E., Arriaga, E. A., Ladiges, W. L., Tchkonia, T., … Niedernhofer, L. J. (2018). Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine*, *36*, 18–28. https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2018.09.015/ATTACHMENT/CCA0B7C9-8B73-4A30-8062-383F62C06DE6/MMC1.PDF

Yu, T., Park, Y., Johnson, J. M., & Jones, D. P. (2009). apLCMS-adaptive processing of high-resolution LC/MS data. *Bioinformatics*, *25*(15), 1930–1936. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp291

Yu, T., Park, Y., Li, S., & Jones, D. P. (2013). Hybrid feature detection and information accumulation using high-resolution LC-MS metabolomics data. *Journal of Proteome Research*, *12*(3), 1419–1427.

https://doi.org/10.1021/PR301053D/SUPPL_FILE/PR301053D_SI_001.PDF

Yu, T., & Peng, H. (2010). Quantification and deconvolution of asymmetric LC-MS peaks using the bi-Gaussian mixture model and statistical model selection. *BMC Bioinformatics*, *11*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-559/FIGURES/5

Yun, S. P., Kam, T. I., Panicker, N., Kim, S., Oh, Y., Park, J. S., Kwon, S. H., Park, Y. J., Karuppagounder, S. S., Park, H., Kim, S., Oh, N., Kim, N. A., Lee, S., Brahmachari, S., Mao, X., Lee, J. H., Kumar, M., An, D., … Ko, H. S. (2018). Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nature Medicine 2018 24:7*, *24*(7), 931–938. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0051-5

Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L. L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. *Journal of Neuroscience*, *32*(18), 6391–6410. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012

Zamboni, N., Saghatelian, A., & Patti, G. J. (2015). Defining the Metabolome: Size, Flux, and Regulation. *Molecular Cell*, *58*(4), 699–706. https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2015.04.021

Zelena, E., Dunn, W. B., Broadhurst, D., Francis-McIntyre, S., Carroll, K. M., Begley, P., O'Hagan, S., Knowles, J. D., Halsall, A., Wilson, I. D., & Kell, D. B. (2009). Development of a robust and repeatable UPLC - MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *Analytical Chemistry*, *81*(4), 1357–1364. https://doi.org/10.1021/AC8019366/SUPPL_FILE/AC8019366_SI_001.PDF

Zeller, K., Rahner-Welsch, S., & Kuschinsky, W. (1997). Distribution of Glut1 glucose transporters in different brain structures compared to glucose utilization and capillary density of adult rat brains. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *17*(2), 204–209. https://doi.org/10.1097/00004647-199702000-00010

Zhang, B., Carroll, J., Trojanowski, J. Q., Yao, Y., Iba, M., Potuzak, J. S., Hogan, A. M. L., Xie, S. X., Ballatore, C., Smith, A. B., Lee, V. M. Y., & Brunden, K. R. (2012). The Microtubule-Stabilizing Agent, Epothilone D, Reduces Axonal Dysfunction, Neurotoxicity, Cognitive Deficits, and Alzheimer-Like Pathology in an Interventional Study with Aged Tau Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience*, *32*(11), 3601–3611. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4922-11.2012

Zhang, B., Gaiteri, C., Bodea, L. G., Wang, Z., McElwee, J., Podtelezhnikov, A. A., Zhang, C., Xie, T., Tran, L., Dobrin, R., Fluder, E., Clurman, B., Melquist, S., Narayanan, M., Suver, C., Shah, H., Mahajan, M., Gillis, T., Mysore, J., … Emilsson, V. (2013). Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell*, *153*(3), 707–720. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.03.030/ATTACHMENT/1E5F4372-679D-4799-986B-A87F27AEA2A9/MMC1.XLSX

Zhang, B., & Horvath, S. (2005). A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, *4*(1). https://doi.org/10.2202/1544-6115.1128/MACHINEREADABLECITATION/RIS

Zhang, G., Zhong, J., Lin, L., & Liu, Z. (2021). Loss of ATP5A1 Enhances Proliferation and Predicts Poor Prognosis of Colon Adenocarcinoma. *Pathology - Research and Practice*, 153679. https://doi.org/10.1016/J.PRP.2021.153679

Zhang, Haiying, Zhang, D., Ray, K., & Zhu, M. (2009). Mass defect filter technique and its applications to drug metabolite identification by high-resolution mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, *44*(7), 999–1016. https://doi.org/10.1002/JMS.1610

Zhang, Hui, Nakajima, S., Kato, H., Gu, L., Yoshitomi, T., Nagai, K., Shinmori, H., Kokubo, S., & Kitamura, M. (2013). Selective, potent blockade of the IRE1 and ATF6 pathways by 4-phenylbutyric acid analogues. *British Journal of Pharmacology*, *170*(4), 822–834. https://doi.org/10.1111/BPH.12306

Zhang, J., Yang, J., Lin, C., Liu, W., Huo, Y., Yang, M., Jiang, S. H., Sun, Y., & Hua, R. (2020). Endoplasmic Reticulum stress-dependent expression of ERO1L promotes aerobic glycolysis in Pancreatic Cancer. *Theranostics*, *10*(18), 8400–8414. https://doi.org/10.7150/THNO.45124

Zhang, M., Schmitt-Ulms, G., Sato, C., Xi, Z., Zhang, Y., Zhou, Y., George-Hyslop, P. S., & Rogaeva, E. (2016). Drug Repositioning for Alzheimer's Disease Based on Systematic 'omics' Data Mining. *PLOS ONE*, *11*(12), e0168812. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0168812

Zhang, P., Kishimoto, Y., Grammatikakis, I., Gottimukkala, K., Cutler, R. G., Zhang, S., Abdelmohsen, K., Bohr, V. A., Misra Sen, J., Gorospe, M., & Mattson, M. P. (2019). Senolytic therapy alleviates Aβ-associated oligodendrocyte progenitor cell

senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nature Neuroscience 2019 22:5*, *22*(5), 719–728. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0372-9

Zhang, Q., Yang, L., Guan, G., Cheng, P., Cheng, W., & Wu, A. (2020). LOXL2 Upregulation in Gliomas Drives Tumorigenicity by Activating Autophagy to Promote TMZ Resistance and Trigger EMT. *Frontiers in Oncology*, *10*, 2365. https://doi.org/10.3389/FONC.2020.569584/BIBTEX

Zhang, T., Li, N., Sun, C., Jin, Y., & Sheng, X. (2020). MYC and the unfolded protein response in cancer: synthetic lethal partners in crime? *EMBO Molecular Medicine*, *12*(5). https://doi.org/10.15252/EMMM.201911845

Zhang, T., Su, J., Guo, B., Wang, K., Li, X., & Liang, G. (2015). Apigenin protects blood–brain barrier and ameliorates early brain injury by inhibiting TLR4-mediated inflammatory pathway in subarachnoid hemorrhage rats. *International Immunopharmacology*, *28*(1), 79–87. https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2015.05.024

Zhang, X., Lu, X., Shi, Q., Xu, X. Q., Leung, H. C. E., Harris, L. N., Iglehart, J. D., Miron, A., Liu, J. S., & Wong, W. H. (2006). Recursive SVM feature selection and sample classification for mass-spectrometry and microarray data. *BMC Bioinformatics*, *7*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-197/FIGURES/1

Zhang, Y., & Barres, B. A. (2010). Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Current Opinion in Neurobiology*, *20*(5), 588–594. https://doi.org/10.1016/J.CONB.2010.06.005

Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O'Keeffe, S., Phatnani, H. P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S. A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B. A., & Wu, J. Q. (2014). An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, *34*(36), 11929–11947. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014

Zhang, Y., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. A., Blumenthal, P. D., Vogel, H., Steinberg, G. K., Edwards, M. S. B., Li, G., Duncan, J. A., Cheshier, S. H., Shuer, L. M., Chang, E. F., Grant, G. A., Gephart, M. G. H., & Barres, B. A. (2016). Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*, *89*(1), 37–53. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013

Zhang, Z., Ma, Z., Zou, W., Guo, H., Liu, M., Ma, Y., & Zhang, L. (2019). The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions. *BioMed Research International*, *2019*. https://doi.org/10.1155/2019/9605265

Zhao, J., O'Connor, T., & Vassar, R. (2011). The contribution of activated astrocytes to Aβ production: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Neuroinflammation 2011 8:1*, *8*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-150

Zhao, W., He, X., Hoadley, K. A., Parker, J. S., Hayes, D. N., & Perou, C. M. (2014). Comparison of RNA-Seq by poly (A) capture, ribosomal RNA depletion, and DNA microarray for expression profiling. *BMC Genomics*, *15*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-419/FIGURES/4

Zhao, Yan, & Zhao, B. (2013). Oxidative stress and the pathogenesis of alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. https://doi.org/10.1155/2013/316523

Zhao, Yaxing, Wong, L., & Goh, W. W. Bin. (2020). How to do quantile normalization correctly for gene expression data analyses. *Scientific Reports 2020 10:1*, *10*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-020-72664-6

Zhao, Yingdong, Li, M. C., Konaté, M. M., Chen, L., Das, B., Karlovich, C., Williams, P. M., Evrard, Y. A., Doroshow, J. H., & McShane, L. M. (2021). TPM, FPKM, or Normalized Counts? A Comparative Study of Quantification Measures for the Analysis of RNA-seq Data from the NCI Patient-Derived Models Repository. *Journal of Translational Medicine*, *19*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/S12967-021-02936-W/FIGURES/5

Zhao, Z. A., Zhao, Y., Ning, Y. L., Yang, N., Peng, Y., Li, P., Chen, X. Y., Liu, D., Wang, H., Chen, X., Bai, W., Chen, J. F., & Zhou, Y. G. (2017). Adenosine A2A receptor inactivation alleviates early-onset cognitive dysfunction after traumatic brain injury involving an inhibition of tau hyperphosphorylation. *Translational Psychiatry 2017 7:5*, *7*(5), e1123–e1123. https://doi.org/10.1038/tp.2017.98

Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discovery 2020 6:1*, *6*(1), 1–22. https://doi.org/10.1038/s41421-020-0167-x

Zheng, H., Cheng, B., Li, Y., Li, X., Chen, X., & Zhang, Y. W. (2018). TREM2 in Alzheimer's Disease: Microglial Survival and Energy Metabolism. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*, 395. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2018.00395/BIBTEX

Zhou, M., Xu, R., Kaelber, D. C., & Gurney, M. E. (2020). Tumor Necrosis Factor (TNF) blocking agents are associated with lower risk for Alzheimer's disease in patients with rheumatoid arthritis and psoriasis. *PLOS ONE*, *15*(3), e0229819. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0229819

Zhu, C., Xu, B., Sun, X., Zhu, Q., & Sui, Y. (2016). Targeting CCR3 to Reduce Amyloid-β Production, Tau Hyperphosphorylation, and Synaptic Loss in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology 2016 54:10*, *54*(10), 7964–7978. https://doi.org/10.1007/S12035-016-0269-5

Zhu, D., Elisevich, K., Maestro, R. F. D., & Belliveau, D. J. (1992). In Vivo Growth of C6 Glioma Cells Transfected with Connexin43 cDNA. *Cancer Research*, *52*(15), 4208–4213. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1322238/

Zhu, F., Li, C., Chu, F., Tian, X., & Zhu, J. (2020). Target Dysbiosis of Gut Microbes as a Future Therapeutic Manipulation in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *12*, 302. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2020.544235/BIBTEX

Zhu, J., Li, W., & Mao, Z. (2011). Cdk5: Mediator of neuronal development, death and the response to DNA damage. *Mechanisms of Ageing and Development*, *132*(8–9), 389–394. https://doi.org/10.1016/J.MAD.2011.04.011

Zhu, X., Chen, Z., Shen, W., Huang, G., Sedivy, J. M., Wang, H., & Ju, Z. (2021). Inflammation, epigenetics, and metabolism converge to cell senescence and ageing: the regulation and intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2021 6:1*, *6*(1), 1–29. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00646-9

Zhu, Y., Doornebal, E. J., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Wentworth, M., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., Tchkonia, T., & Kirkland, J. L. (2017). New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-X_L inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging*, *9*(3), 955–963. https://doi.org/10.18632/AGING.101202

Zimmer, E. R., Leuzy, A., Benedet, A. L., Breitner, J., Gauthier, S., & Rosa-Neto, P. (2014). Tracking neuroinflammation in Alzheimer's disease: The role of positron emission tomography imaging. *Journal of Neuroinflammation*, *11*(1), 1–12. https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-11-120

Zimmermann, G. R., Lehár, J., & Keith, C. T. (2007). Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discovery Today*, *12*(1–2), 34–42. https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2006.11.008

Zlokovic, B. V. (2008). The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron*, *57*(2), 178–201. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2008.01.003

Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K. A., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (2002). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neuroscience 2002 6:1*, *6*(1), 43–50. https://doi.org/10.1038/nn980

Zyprych-Walczak, J., Szabelska, A., Handschuh, L., Górczak, K., Klamecka, K., Figlerowicz, M., & Siatkowski, I. (2015). The Impact of Normalization Methods on RNA-Seq Data Analysis. *BioMed Research International*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/621690

IX. APÉNDICES

1. Publicaciones científicas y manuscritos de publicación asociados a la tesis

1.1. Publicación transcriptómica: "*Transcriptomic analyses of neurotoxic astrocytes derived from adult triple transgenic Alzheimer's disease mice*", Carvalho et al. 2023

El siguiente manuscrito fue recientemente aceptado para su publicación en la revista *Journal of Molecular Neuroscience*.

Transcriptomic analyses of neurotoxic astrocytes derived from adult triple transgenic Alzheimer's disease mice

Diego Carvalho[a], Pablo Diaz-Amarilla[b,†], Rosina Dapueto[b], María Daniela Santi[b,1], Pablo Duarte[b], Eduardo Savio[b], Henry Engler[b,2], Juan A. Abin-Carriquiry[a,3**], Florencia Arredondo[a,b*]

[a] Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, 11600 Montevideo, Uruguay.

[b] Área I+D Biomédica, Centro Uruguayo de Imagenología Molecular, 11600 Montevideo, Uruguay.

* Corresponding author. Área I+D Biomédica, Centro Uruguayo de Imagenología Molecular, 11600 Montevideo, Uruguay.

** Corresponding author. Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, 11600 Montevideo, Uruguay.

E-mail addresses: florencia.arredondo@cudim.org (F. Arredondo), ja.abin@gmail.com (J.A. Abin-Carriquiry).

[1] Present affiliation address: Bluestone Center for Clinical Research, College of Dentistry, New York University, 10010 New York, USA.

[2] Present affiliation address: Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay.

[3] Present affiliation address: Laboratorio de Biofármacos, Institut Pasteur de Montevideo, 11600 Montevideo, Uruguay.

[†] Deceased.

Abstract

Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease have been classically studied from a purely neuronocentric point of view. More recent evidences support the notion that other cell populations are involved in disease progression. In this sense, the possible pathogenic role of glial cells like astrocytes is increasingly being recognized. Once faced with tissue damage signals and other stimuli present in disease environments, astrocytes suffer many morphological and functional changes, a process referred as reactive astrogliosis. Studies from murine models and humans suggest that these complex and heterogeneous responses could manifest as disease-specific astrocyte phenotypes. Clear understanding of disease associated astrocytes is a necessary step to fully disclose neurodegenerative processes, aiding in the design of new therapeutic and diagnostic strategies.

In this work we present the transcriptomics characterization of neurotoxic astrocytic cultures isolated from adult symptomatic animals of the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease (3xTg-AD). According to the observed profile, 3xTg-AD neurotoxic astrocytes show various reactivity features including alteration of the extracellular matrix and release of pro-inflammatory and proliferative factors that could result in harmful effects to neurons. Moreover, these alterations could be a consequence of stress responses at the endoplasmic reticulum and mitochondria as well as of concomitant metabolic adaptations. Present results support the hypothesis that adaptive changes of astrocytic function induced by a stressed microenvironment could later promote harmful astrocyte phenotypes and further accelerate or induce neurodegenerative processes.

Keywords: Adult 3xTg-AD mice; Astrocytes; Neurodegeneration; Alzheimer's disease, Transcriptomics

Acknowledgments

This work wouldn't exist without the efforts of Dr. Pablo Díaz-Amarilla. Diego Carvalho specially thanks him for all the help received at the start of his thesis, as well as his honest pursuit of science.

We thank Dr. Matthew Ryan Smith from Emory University for his aid in metabolic results interpretation. We would also like to thank all the team of CUDIM animal facility for their crucial work in animal care and assistance.

Funding: This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (grant numbers: POS_NAC_2017_1_140673, MOV_CA_2018_1_149736, PD_NAC_2018_1_149726), UK Embassy in Montevideo (grant number: UK_ID_2015-1-7), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), and Comisión Académica de Posgrado (CAP).

1. Introduction

Astrocytes are abundant and ubiquitous glial cells of the Central Nervous System (CNS) originated from neural progenitors. Once considered bystander cells, astrocytes are now being increasingly recognized as crucial players in brain function specially due to its involvement in supportive and regulatory processes including maintenance of the blood brain barrier (BBB), neuronal metabolic support, production of antioxidants, water and ion homeostasis (pH, K+ buffering), dendrite outgrowth, synapse development and plasticity, gap-junction communication, neurotransmitter regulation (glutamate and GABA, ATP, D-serine, among others) and immune responses (Sofroniew and Vinters 2010; Verkhratsky and Nedergaard 2017). Increasing evidence shows that astrocytes present a diversity of subtypes and states closely related to their role in health and disease processes. Considering their anatomical distribution astrocytes can be broadly classified into white matter astrocytes (fibrous), grey matter astrocytes (protoplasmic), ependymal astrocytes, radial glia, and perivascular astrocytes (Verkhratsky and Nedergaard 2017). In addition, as part of the brain defense and repairing processes astrocytes can differentiate into a number of states broadly called astrocyte reactivity. Structural and functional changes associated with astrocyte reactivity are observed during aging, infection, trauma, ischemia as well as neurodegenerative diseases among other processes (Dossi et al. 2018; Sofroniew 2020). Morphological changes classically associated with its reactivity include increased expression of structural proteins such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin, hypertrophy of the soma and cell projections, and proliferation. It is worth noting that these features are a narrow representation of context dependent processes. More detailed studies regarding structural, developmental and functional diversity of astrocytes from distinct brain regions are an ongoing area of research (Chai et al. 2017; Sofroniew 2020).

Reactive astrogliosis provide adaptive functions that help preserve neuronal tissue in multiple disorders, even though in contexts like excessive neuro-inflammation it can also be associated with loss of astrocyte homeostatic functions or even gain of detrimental functions (Glass et al. 2010; Heneka et al. 2014; Sofroniew 2020). In this sense, astrocyte dysfunction could be involved in many diseases of the nervous system, such as Alzheimer's disease (Heneka et al. 2015; Acosta et al. 2017). Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder manifested by progressive cognitive impairment and memory loss. The underlying neuropathology includes brain deposition of aggregates of misfolded amyloid-β (Abeta) peptide, hyperphosphorylated microtubule-associated protein tau and neuronal loss (Selkoe and Hardy 2016). It is postulated that stress conditions associated with the disease microenvironment may trigger reinforcing interactions between astrocytes and other glial cells resulting in a compromise of astrocyte and neuronal function as well as chronic neuroinflammation (Wheeler et al. 2019; Joshi et al. 2019; Sofroniew 2020). This could result in astrocyte detrimental effects like altered homeostasis of neurotransmitters glutamate and GABA, K+ and Ca+ ion homeostasis, release of pro-inflammatory mediators, build-up of intracellular Abeta, and a reduced proliferative capacity of reactive astrocytes during aging (Nagele et al. 2003; Grimaldi et al. 2019; Sofroniew 2020). Deleterious effects of astrocytic populations have been observed in other diseases and animal models (Varcianna et al. 2019; Spanos and Liddelow 2020). Some examples include the “aberrant” astrocytes isolated from SOD1G93A transgenic

mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, the ischemia derived astrocytes isolated from early ischemic penumbra and core of adult rats, or the more broadly defined inflammatory type “A1” astrocytes (Díaz-Amarilla et al. 2011; Zamanian et al. 2012; Villarreal et al. 2016). These astrocytes present an increased proliferative capacity and neurotoxic effects associated with the secretion of toxic factors in the conditioned media. In our previous study, we isolated and cultivated astrocytes from cortex and hippocampus of symptomatic 9-10 months-old 3xTg-AD mice (old 3xTg-AD astrocytes), a model of AD which replicates most of the disease features including plaque and tangle pathology, age cognitive deficits, astrocyte reactivity and brain atrophy (Oddo et al. 2003b, a; Bittner et al. 2010; Giuliani et al. 2013, 2014; Belfiore et al. 2019; Chiquita et al. 2019; Javonillo et al. 2022). These old 3xTg-AD astrocytes showed differential expression of astrocytic markers compared to controls. Likewise, in line with the previous examples, they presented a high rate of proliferation and were neurotoxic to primary neuronal cultures both in neuron-astrocyte co-cultures and when their conditioned medium (ACM) was added to the neuronal cultures (Diaz-Amarilla et al. 2022).

Characterizing the cellular and molecular mechanisms underlying the effects of reactive astrocytes in AD represents a key research goal. Thus, in the present work we further studied these old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes through transcriptomics lens. The observed transcript profile suggested a particular reactivity state, produced from underlying stress responses such as an unfolded protein response related to endoplasmic reticulum (ER) stress. Old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes presented signals of metabolic adaptation to cellular stress at the mitochondria, glycolysis and other energetic routes as well as alteration of the extracellular matrix and release of pro-inflammatory and proliferative factors. These alterations would constitute adaptive microenvironmental-induced changes in astrocyte function during disease progression that could later promote or accelerate neurodegeneration through synergic mechanisms.

2. Methods

2.1. Materials

All reagents were acquired from Sigma unless otherwise stated.

2.2. Animals

All procedures using laboratory animals were performed in accordance with the international guidelines for the use of live animals and were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (CEUA-CUDIM) as established by the National Committee of Animal Experimentation (CNEA). Mice of female sex homozygous 3xTg-AD (B6;129-Tg(APPSwe, tauP301L)1Lfa Psen1$^{(tm1Mpm)}$/Mmjax strain) (Oddo et al. 2003b) and wild-type non-transgenic female mice (Non-Tg) (C57BL/6J strain) (The Jackson Laboratory) were bred and housed in CUDIM SPF centralized animal facility with a 12-h light-dark cycle and *ad libitum* access to food and water.

2.3. Astrocyte cultures from adult and neonatal mice

Old 3xTg-AD astrocytes were prepared from the cerebral cortex and hippocampus of 9-10-months-old 3xTg-AD mice according the methods described previously (Diaz-Amarilla et al. 2022). Cells were isolated from female mice, since in the 3xTg-AD model sexual differences have been observed in the development of the pathology, such as expression of plaques and tangles and behavioral deficits, with a greater expression of transgenes in females (Clinton et al. 2007; Carroll et al. 2010; Belfiore et al. 2019). Processed cells were plated in tissue flasks and then maintained at 37 °C in a humidified 5 % CO_2 incubator. Culture medium was removed after 7 days *in vitro* (DIV), then replaced every 3-4 days, and at 21-28 DIV were passaged for the first time. Cells were amplified and maintained at 37 °C in a humidified 5 % CO_2 incubator.

As previously reported, the low yield achieved from astrocytes isolation of 9-10-months-old non-Tg mice prevented their use with statistical value in our studies (Diaz-Amarilla et al. 2022). Thus, astrocytic cultures derived from neonatal non-Tg mice as well as astrocytes from neonatal 3xTg-AD mice were used as controls. The latter non-toxic controls allowed us to assess whether astrocytes from this mice model of AD exhibit alterations when isolated before the disease onset. To do so, primary neonatal astrocytes were prepared from the cerebral cortex and hippocampus of new-born (postnatal day 0-2) 3xTg-AD, and C57BL/6J mice according the methods described by Cassina et al. with minor modifications (Cassina et al. 2002; Diaz-Amarilla et al. 2022). Briefly, the tissues were minced and then dissociated both enzymatically (in trypsin 0.25 %/EDTA 0.02 % for 10 min at 37 °C) and mechanically to obtain single cell suspension. After that, remains of not disaggregated tissue were allowed to decant for 2 min without disturbing the cell suspension. Once plated, cell culture medium was changed once every 2-3 days. When cells grew to confluence after approximately 10 DIV, flasks were vigorously shaken to remove the loosely attached contaminant cells such as microglia and oligodendrocyte progenitor cells (OPCs). They were later incubated for another 48 h with 10 µM cytosine arabinoside, and then amplified and maintained at 37 °C in a humidified 5 % CO_2 incubator.

2.4. RNA-seq analysis

2.4.1. Sample processing

Total RNA was extracted from adult 3xTg-AD, neonatal 3xTg-AD and non-Tg astrocytic cultures plated in 35 mm Petri dishes by a three stage process with Trizol (TRI Reagent® Sigma-Aldrich T9424), column purification (PureLink™ RNA mini kit Cat. 12183018A) and removal of contaminant DNA with DNAse treatment (PureLink™ DNase Set Cat. 12185010) according to manufacturer-recommended procedures. Three biological replicate samples were used for RNA isolation for each experimental group. RNA sample quality was verified using a Bioanalyzer (RNA Integrity Number > 8 for all samples). Samples were stored in RNAStable (RNAstable® Tube Kit Ref. 93221-001) before shipping. Library preparation with poly-A selection (NEBNext) and high throughput sequencing were performed at by GENEWIZ Inc. (South Plainfield, NJ) using an Illumina HiSeq (2x150 bp, ~38 M depth).

2.4.2. Bioinformatics

Raw data was processed according to previous described protocols (Love et al. 2015; Chen et al. 2016; Smyth et al. 2018). Preliminary quality control was performed with FastQC. Adapters, low quality reads,

etc. were trimmed with SeqPurge (phred score > 33) (Sturm et al. 2016). Read alignment, count and annotation was performed in R with package Rsubread (Liao et al. 2019) and function featureCounts (Liao et al. 2014) using mouse reference genome GRCm38, paired-end reads and multi mapping allowed. Reads were annotated sing Rsubread mm10 in-built annotations from NCBI-RefSeq. Around 16000 transcripts were detected with at least 0.5 counts per million bases in at least two samples. Statistical analyses were performed with package edgeR (Robinson et al. 2010). Differential gene expression analysis was performed with limma-voom (p value 0.05, 5 % FDR) (Law et al. 2014). A comprehensive and lenient approach for gene ontology and pathway analysis was performed by joining results of GAGE, camera and goana package and functions (Luo et al. 2009; Young et al. 2010; Wu and Smyth 2012). Top GO terms were selected if p-value < 0.01 for either GAGE or camera functions or < 1E-04 for goana function. Enriched GO terms were further prioritized using GOxploreR function which considers each term position in the ontology hierarchy (Manjang et al. 2020). Plots of the relative importance of each GO term were generated with REVIGO web server using minimum p-value observed (Supek et al. 2011). Enriched KEGG pathways were gathered if p-value < 0.01 for any of the previous functions. Colored KEGG maps of selected pathways were generated with the aid KEGG Mapper color tool (Kanehisa et al. 2021). Network interactions of selected differentially expressed genes (DEGs) were plotted with STRING database web server (Szklarczyk et al. 2019).

2.5. Western blotting

Astrocytes confluent monolayers were washed with PBS and then lysed with appropriate buffer containing 50 mM Hepes (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1% Triton X-100 and complete protease inhibitor mixture (Roche cOmplete™ Ref. 11697498001). Protein quantification was achieved using a Bicinchoninic Acid (BCA) kit. Protein samples were prepared in Laemmli sample buffer 5x, resolved on 12 % SDS-PAGE gels and transferred onto PDVF membranes (BioRad) using a wet transfer system. Membranes were blocked in 5 % dried milk in TBS-T (0.5 mM Tris base, pH 8, 75 mM NaCl and 0.2 % (vol/vol) Tween-20) for at least 2 h at room temperature. Membranes were incubated with primary antibody diluted in 2 % BSA in TBS-T and then with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody diluted in 2 % BSA in TBS-T for 1h. Membranes were developed using chemiluminescent substrates (Thermo). Primary antibodies used in the study include: anti-β-actin (1-4000) (A5441 Sigma), anti-GLT1 (1-500) (PA5-17099 Thermo Fisher), anti-Nestin (ab11306 Abcam), OxPhos Rodent WB Antibody Cocktail (1-1000) (45-8099 Thermo Fisher).

3. Results and Discussion

3.1. Transcriptomic profile distinguishes adult symptomatic 3xTg-AD mice-derived astrocytes from those obtained from 3xTg-AD neonates

Neurotoxic astrocytes obtained from adult symptomatic 3xTg-AD mice (Tg.Old) were studied and compared against neonatal astrocytes obtained from 3xTg-AD mice (Tg.Neo). Multivariate analysis, PCA and clustering analysis, showed a clear distinction between neurotoxic astrocytes and non-toxic control astrocytes (Fig. 1). Notably most of the variation was observed on the first principal component, leaving a minor variation in the second component where the neonatal control group was distributed. Analysis

of differential gene expression showed around 2500 up-regulated and 3300 down-regulated genes from a total of around 16400 transcripts that passed the expression threshold criteria. Although the focus of the present study is to assess astrocytic changes that have arisen from age and disease progression but not from transgenesis *per se*, our experimental design also included astrocytes isolated from neonatal wild-type mice (Wt.Neo). A comparison including this group showed that it clusters together with the Tg.Neo astrocytes on the PCA scores plot and in the hierarchical clustering plot (see Online Resource 1, Fig. S1). No differentially expressed genes were found either under the current criteria. These results further corroborate our previous findings where both Tg.Neo and Wt.Neo astrocytes behaved equally and showed no signs of neurotoxicity, thus supporting the idea that old 3xTg-AD astrocytes are a product of age and disease progression (Diaz-Amarilla et al. 2022).

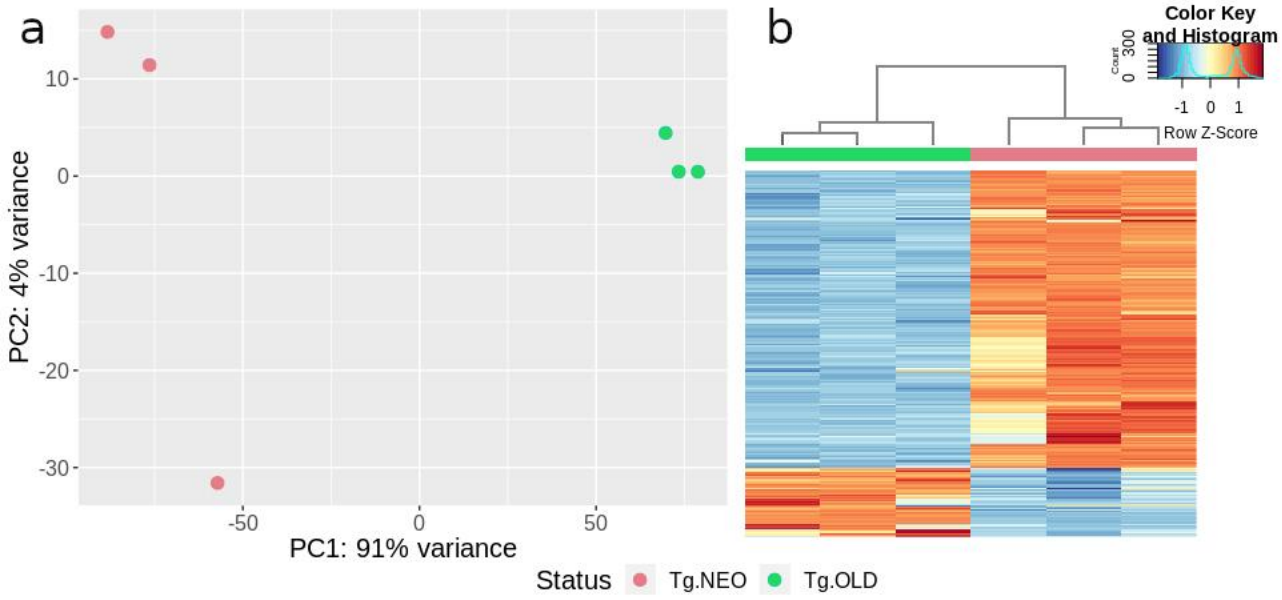


Fig. 1 Multivariate statistical analysis of astrocytes transcriptomes. (**a**) PCA analysis. (**b**) Hierarchical clustering of top 500 most variable transcripts

Astrocyte diversity extends through both anatomical and developmental dimensions, as well as differentiating into reactive states under stress conditions (Khakh and Sofroniew 2015; Sofroniew 2020). Multiple markers have been associated with the astrocyte lineage and its different states, each with different degree of specificity, being the most classical markers GFAP, glutamine synthetase (GS, Glul), Aldh1l1 and S100b among others (Cahoy et al. 2008; Boisvert et al. 2018; Zhang et al. 2019). As an approach to characterize 3xTg-AD neurotoxic astrocytes and place them into astrocyte diversity evidenced so far, we assessed the expression of broad astrocyte markers on the transcriptomics data. A list of markers was gathered from literature sources and online databases (Cahoy et al. 2008; Molofsky et al. 2012; Zhang et al. 2014; Boisvert et al. 2018) (see full list of markers and associated references in Online Resource 2). From the transcriptomics data analyzed, we found a group of typical astrocyte markers not differentially expressed (Glul, S100b, Cd44, Gjb6/Cx30, Slc4a4, etc.); a second group of down-regulated markers (Gfap, Slc1a2/GLT1/EAAT2, Nes/Nestin, Aldh1l1, Sox9, Aqp4, Slc1a3/GLAST/EAAT1, etc.) and a third subset of up-regulated astrocyte markers (Fig. 2). Considering

expression log fold change (logFC), some of the most remarkable astrocytic markers in Tg.Old cells would be Dio2, Slc7a11, Aqp1 and Slc1a6/EAAT4 with logFC above 4. Dio2 is an enzyme related to thyroid hormone metabolism (Morte and Bernal 2014). The cystine-glutamate exchanger (xCT, Slc7a11) is a membrane transporter that promotes glutathione synthesis by catalyzing cysteine uptake and glutamate release. It appears to be expressed in scattered astrocytes throughout the mouse brain and more strongly in select blood-brain-CSF interface areas (Ottestad-Hansen et al. 2018). Slc1a6 is a glutamate transporter expressed both in astrocytes and cerebellar Purkinje cells (Hu et al. 2003). Similarly water channel Aqp1 is expressed in both neurons and astrocytes but with some regional specificity (Gao et al. 2012). Other interesting astrocyte markers up-regulated in the transcriptomics data are Tumor protein D53 (Tpd52l1) and frizzled homolog 2 (Fzd2). Tpd52l1 is associated with calcium signaling and cell cycle and Fzd2 is a Wnt receptor found selectively and highly expressed in mouse astrocytes (Boutros and Byrne 2005; Cahoy et al. 2008; McKenzie et al. 2018).

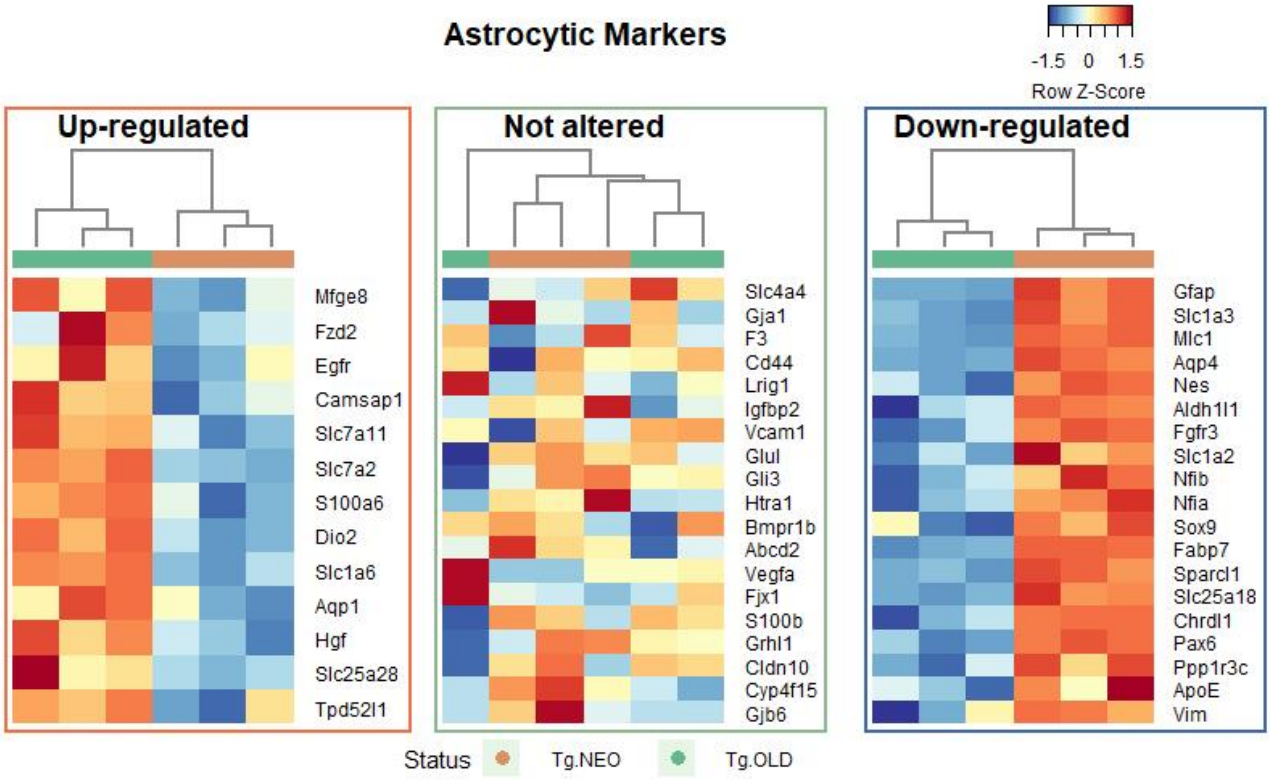


Fig. 2 Astrocyte markers up-regulated, not altered and down-regulated in Tg.Old astrocytes transcriptome. Markers broadly associated with astrocytes were gathered from literature and online databases (Cahoy et al. 2008; Molofsky et al. 2012; Zhang et al. 2014; Boisvert et al. 2018). For brevity only a marker subset is represented (see full marker list and associated literature references in Online Resource 2)

Noteworthy some of the suggested up-regulated markers are related with astrocyte function in disease (Fig. 2). Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1 (Camsap1) is a cytoskeleton-associated protein expressed on both GFAP-negative and GFAP-positive astrocytes (Yoshioka et al. 2012). In rats Camsap1 immunoreactivity was observed in ependymal cells bearing various astrocyte markers, and increased after injury, suggesting that this could be a marker of newly born astrocytes (Yoshioka et al.

2012). Milk fat globule epidermal growth factor 8 (Mfge8) is a secreted phagocytic protein that might increase with age in mouse and possibly has a role in astrocyte reactivity regulation (Clarke et al. 2018; Xu et al. 2019; Li et al. 2019). S100a6 (Calcyclin) is calcium binding protein involved in proteolytic degradation, cytoskeletal dynamics and cell proliferation and associated with neural and astrocyte precursors in the mouse hippocampus (Hoyaux et al. 2002; Yoshioka et al. 2012). Noteworthy, expression of this protein is linked to impaired axons from both amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mouse model and human patients, and it is induced in mouse astrocytes after stroke (Hoyaux et al. 2002; Zamanian et al. 2012). Another interesting marker is the carrier protein Slc25a28, which could also be associated with mitochondrial dysfunction (Babenko et al. 2018).

Down-regulation of GFAP was also observed at the protein level by western blot in our previous work (Diaz-Amarilla et al. 2022). In order to further validate our transcriptomic data, here we explored the protein expression of additional cell markers associated with astrocyte function that were observed altered in the transcriptomic profile of Tg.Old astrocytes: Nestin and GLT-1 (Fig. 3). Nestin is a type VI intermediate filament protein expressed in radial glia multipotent progenitors in the embryonic brain, but mature astrocytes do not show Nestin expression and it is also associated with reactive astrocytes (Cho et al. 2013; Potokar et al. 2020; Jurga et al. 2021). GLT-1 (Glutamate transporter-1) is a Na+-dependent transporter that plays a key role in glutamate homeostasis by removing excess glutamate in the CNS. Glutamate excitotoxicity is associated with various neurodegenerative processes (Pajarillo et al. 2019), and reduced expression of this transporter is observed in AD (Monterey et al. 2021). Furthermore, GLT-1 has been proposed as one potential marker for reactive astrocytes in different pathological contexts (Díaz-Amarilla et al. 2011; Escartin et al. 2021), with a decrease in ARNm and protein expression, in accordance with the results described in our present manuscript.

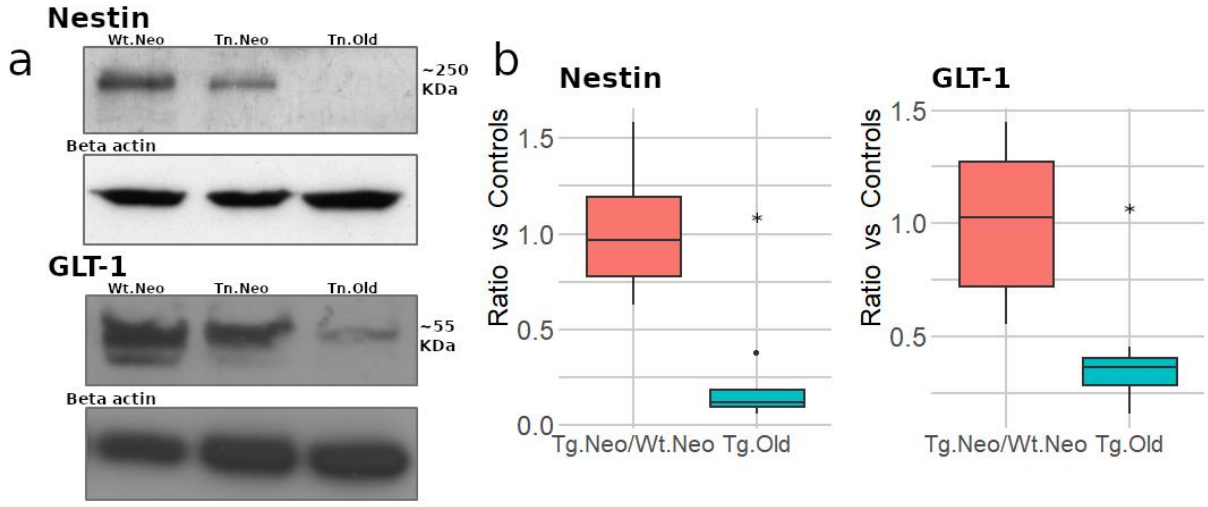


Fig. 3 Protein expression of GLT-1 and Nestin markers in Tg.Old astrocytes. A lenient approach was followed to detect trends in the protein expression: Tg.Old group samples were compared against control samples Tg.Neo and Wt.Neo joined as a single group, values were normalized against Beta actin expression and additionally by the average expression of controls from each assay (Ratio). Under this approach down-regulation of both proteins was observed: Nestin (p.adj = 0.004), GLT-1 (p.adj = 0.01) (Wilcoxon test)

3.2. Reactive astrocytic markers profile of Tg.Old astrocytes

Astrocytes respond to CNS injury and disease through a mechanism referred as reactive astrogliosis that can lead to a wide range of changes in their molecular expression, morphology and function. These changes can in turn influence diverse outcomes in the CNS, from neuroprotection, and preservation of homeostasis and neurological functions, to contribution to detrimental effects through loss of beneficial functions or gain of abnormal functions. Such dysfunctions are regulated by molecular signaling events that are context-specific (Zamanian et al. 2012; Sekar et al. 2015; Sun et al. 2015; Itoh et al. 2017; Henrik Heiland et al. 2019; Diaz-Castro et al. 2019; Wheeler et al. 2020; Al-Dalahmah et al. 2020; Habib et al. 2020; Escartin et al. 2021). Thus, we focus on astrocytic reactivity markers as a way to characterize molecular expression patterns of Tg.Old astrocytes in the context of CNS disorders. In this sense, a list of around 300 markers associated with reactivity was gathered from literature sources (Zamanian et al. 2012; Liddelow and Barres 2017; Escartin et al. 2021; Jurga et al. 2021) (see full list of markers and associated literature references in Online Resource 2). From these, a fraction of around 70 markers was found differentially expressed in the transcriptomics data in a direction consistent with reactivity (see a sample subset in Fig. 4(a)). Considering a logFC threshold of 4 some of the most remarkable up-regulated markers would be Timp1 and Plaur, while from those expected to be down-regulated Slc1a2 (GLT-1, EAA2), Slc1a3 (GLAST) and Kcnj10 (Kir4.1) would be the most remarkable. Alteration of some of these markers has been associated with harmful effects in the CNS. As previously stated, this is the case of the Slc1a2 gene (GLT-1, EAAT2 glutamate transporter) that has been proposed as a potential marker of reactive astrocytes in different pathological contexts (Díaz-Amarilla et al. 2011; Escartin et al. 2021), showing a decrease in mRNA and protein expression which is in agreement with our results (Fig. 2, 3 and 4). In addition to GLT-1, GLAST is another astrocyte glutamate transporter with an important role in glutamate homeostasis, also showing reduced expression in AD (Monterey et al. 2021). Kir4.1 is an inwardly rectifying K+ channel exclusive of glial cells that regulates astrocyte resting membrane potential, cell volume, and facilitates glutamate uptake (Nwaobi et al. 2016). Reduced expression is associated with AD and ALS among other pathologies (Wilcock et al. 2009; Olsen et al. 2015). In particular, decreased astrocytic Kir4.1 current may promote cell cycle progression and proliferation and has been associated with brain trauma, ischemia and inflammation (Nwaobi et al. 2016). Plaur gene encodes a membrane protein that binds the serine proteinase, urokinase-type plasminogen activator (uPA), and activates a cascade of extracellular proteinases that function in tissue remodeling. It has been associated with axonal damage and neuroinflammation in multiple sclerosis as well as glioblastoma cell proliferation (Gveric et al. 2001; Gilder et al. 2018). Timp1 is a cytokine released from astrocytes that has been associated with a neuronal protective effect upon Abeta exposure (Saha et al. 2020).

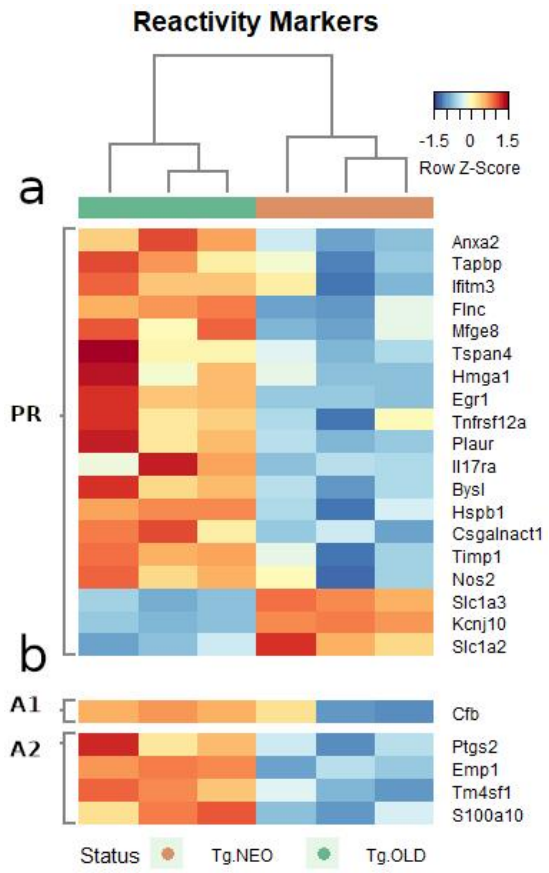


Fig. 4 Reactive astrocyte markers in Tg.Old astrocytes. (**a**) Markers broadly associated with astrocyte reactivity and "pan reactive" markers ("PR"). (**b**) Type "A1" and type "A2" reactive astrocyte markers. Markers were gathered from multiple literature references (Zamanian et al. 2012; Liddelow and Barres 2017; Escartin et al. 2021; Jurga et al. 2021). For brevity, only a subset of markers of those present among DEGs with an expression pattern consistent with reactivity is depicted (see full marker list and associated literature references in Online Resource 2)

Other noteworthy up-regulated reactive astrocytic markers include interferon-induced transmembrane protein 3 (Ifitm3), heat-shock protein B1 (Hspb1), bystin (Bysl) and annexin A2 (Anxa2), which are related with Abeta production, inflammation and proliferation. Ifitm3 promotes Abeta production though interaction with gamma secretase (Hur et al. 2020). Increased Hspb1 is associated with neuroinflammation and can be liberated by astrocytes after exposure to Abeta (Nafar et al. 2016; Dukay et al. 2021). Bystin is an adhesion molecule up-regulated under brain damage, and promotes proliferation though phosphorylation of glycogen synthase kinase-3β (Gsk-3β) (Sha et al. 2020). Anxa2 is a calcium-dependent multifunctional phospholipid-binding protein that promotes glioma proliferation (Chen et al. 2019a).

Recent attempts to molecularly classify reactive astrocytes include the inflammatory type "A1" and the ischemic related type "A2" (Zamanian et al. 2012; Liddelow and Barres 2017). A2 reactive astrocytes have been associated with protective functions while A1 with neurotoxicity and loss of trophic support. Several markers have been proposed to distinguish these cell types *in vitro* and *in vivo* (Liddelow et al. 2017; Clarke et al. 2018). Fig. 4(b) presents type "A1" and "A2" associated markers found among DEGs

up-regulated in Tg.Old astrocytes. Most of the detected DEGs illustrate possible roles of astrocytes in disease even though they cannot be associated with harmful effects a priori. Complement factor b, Cfb, is part of the alternative pathway of complement activation. Polymorphisms of this gene have been associated with AD (Proitsi et al. 2012), and its expression pattern is consistent with the neurotoxic subtype, "A1". Various up-regulated transcripts have been found among the "A2" astrocyte type set. Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2), also known as cyclooxygenase-2 (Cox-2), appears to be the most relevant with logFC 6.8 (remaining DEGs show a logFC above 2). Ptgs2 is a pro-inflammatory enzyme responsible for the conversion of arachidonic acid to prostaglandins and it can be stimulated by Il-1α or inhibition of oxidative phosphorylation (Astakhova et al. 2019). Enhanced expression of this enzyme has been found in affected regions of brains from patients with AD (Yasojima et al. 1999; Ho et al. 2001). Emp1 and S100a10 have been associated with a particular reactivity state caused by astrocyte unfolded protein response (Smith et al. 2020). Epithelial membrane protein 1, Emp1, is a tight junction associated protein involved in the BBB (Bangsow et al. 2008). Plasma membrane protein S100a10 forms a heterotetramer with annexin A2 contributing to the plasminogen activation pathway and other processes like exocytosis (Hedhli et al. 2012). Transmembrane 4 L six family 1 (Tm4sf1) protein is overexpressed in gliomas and other malignant cells (Fu et al., 2020). Beyond these interesting results related to proposed "A1" and "A2" astrocytic types, caution should be taken as these classifications rely mainly in correlative associations (Sofroniew 2020).

In the following sections we resort to gene ontology (GO) and pathway analysis using free resources such as KEGG to achieve a more comprehensive assessment of the transcriptomics profile of Tg.Old astrocytes. In particular, some key alterations will be further discussed in the context of astrocyte physiology and its role in pathology.

3.3. Tg.Old astrocytes phenotype illustrated by gene ontology and pathway analyses

Normal astrocyte function in the CNS involves processes such as neuronal synapse regulation (tripartite synapse), neuronal metabolic support, ion homeostasis, and BBB among others (Sofroniew and Vinters 2010). Gene ontology and pathway analysis in Tg.Old detected altered processes that could impair astrocyte homeostatic role. From enriched GO terms associated with down-regulated transcripts various attenuated processes are suggested (Fig. 5). These include ontologies related with nervous system development, cell adhesion and cell projection development, synapse function and formation and ion transport through the cell membrane. Analysis of the down-regulated KEGG pathways detected in the neurotoxic astrocytes portraits a complementary picture (Fig. 6). In this sense, suggested pathways can be grouped based on their overlap in those associated with synaptic transmission and cell adhesion molecules ("*neuroactive ligand receptor interaction*", "*GABAergic synapse*", "*glutamatergic synapse*", etc.), and those associated with ion transport, calcium signaling and cAMP signaling ("*cAMP signaling pathways*", "*calcium signaling pathway*", "*gastric acid secretion*", etc.) (see Online Resource 1, Fig. S10A). Taken together, the observed changes suggest a decrease in the neuron-supportive activities offered by astrocytes, in particular ion homeostasis, cell adhesion, and synaptic regulation.

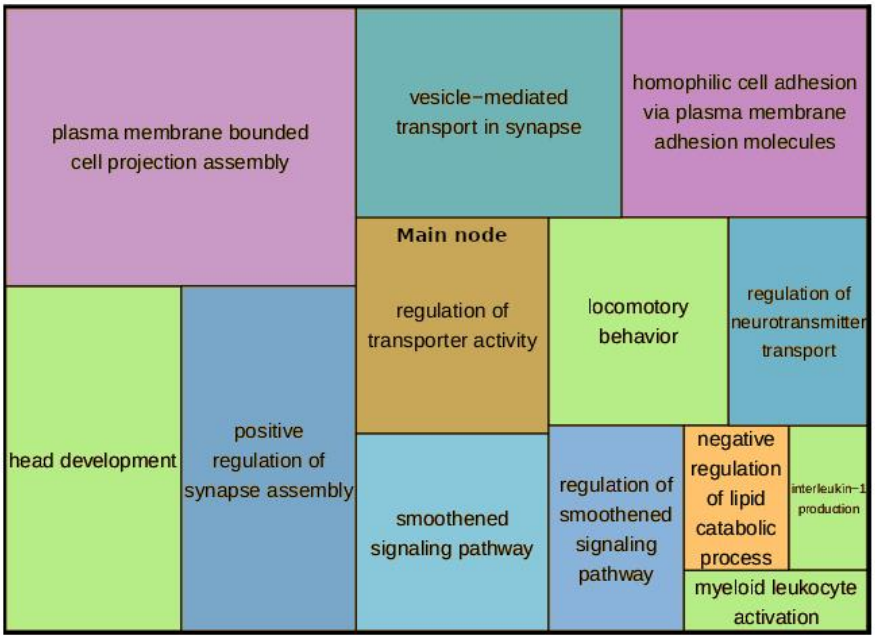


Fig. 5 Enriched GO terms associated with down-regulated transcripts in Tg.Old astrocytes. Only main node is presented, see full schematic in Online Resource 1, Fig. S7. Each rectangle is a representative of a single group of GO terms, which are then associated into 'superclusters' and displayed in different colors. The size of the rectangles is adjusted to reflect the p-value

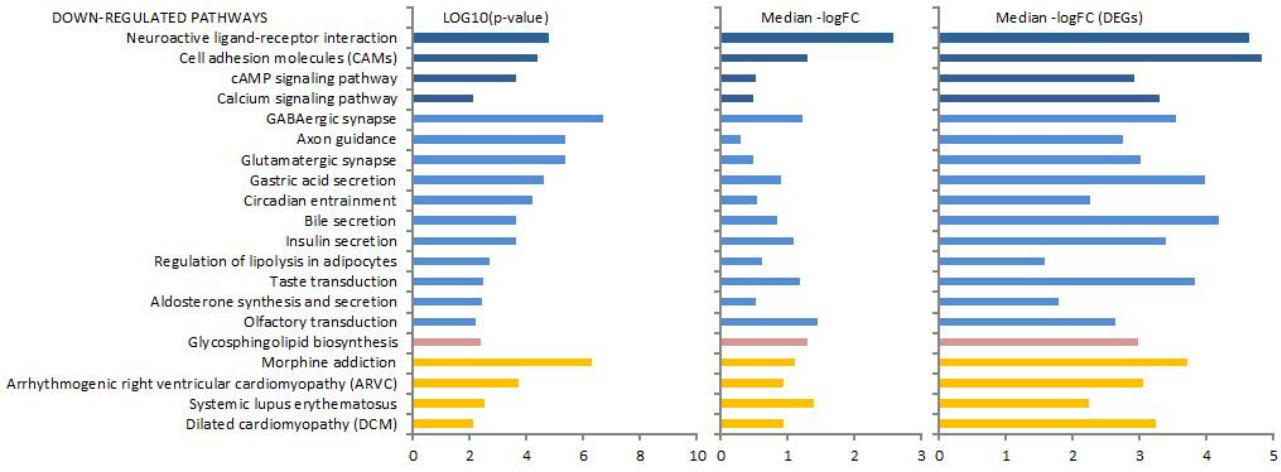


Fig. 6 Enriched KEGG pathways derived from down-regulated transcripts in Tg.Old astrocytes. Pathways are organized according to KEGG class; pathways in blue belong to the following classes: Signal transduction; Signaling molecules and interaction; light blue: Organismal Systems (Nervous system, Development and regeneration; etc.); purple: Metabolism; and yellow: Human diseases. For brevity only the most representative pathways inside each group are included. See Online Resource 1, Fig. S9-10, Table S1-2 for the full list and analysis of pathway overlap. Log10(p-value) takes de minimum p-value among GAGE, camera and goana results, Median logFC considers de median log fold change of all the genes detected in the pathway, Median logFC (DEGs) is restricted to differentially

expressed genes (DEGs). The total amount of DEGs involved in down-regulated pathways is 494 (354 effectively down), with a median fold change of -2.92

Enriched GO terms associated with up-regulated transcripts suggest an alteration of process related to protein synthesis and processing, with a clear involvement of the endoplasmic reticulum (Fig. 7). Moreover, ontologies such as "*regulation of cytokine production*", "*cellular response to unfolded protein*", and "*cell redox homeostasis*" suggest an enhancement of processes related to cell proliferation and inhibition of apoptosis as well as activation of stress responses (see full schematic in Online Resource 1, Fig. S8). In regard of signaling pathways from KEGG, similar processes are suggested (Fig. 8). Among the most confidently up-regulated pathways are those related to protein synthesis and processing such as "*ribosome biogenesis*" and "*protein processing in endoplasmic reticulum*". In another group we find pathways related to cell proliferation, pro-inflammatory pathways and in general response to stress. Metabolic perturbations are also suggested at the energetic level and in the metabolism of amino acids, pyrimidines and glycans. Altered pathways show a considerable overlap of DEGs (see Online Resource 1, Fig. S9). For example "*protein processing in endoplasmic reticulum*" links many of the previously suggested alterations, like protein synthesis and catabolism, stress responses and metabolic alterations in the frame of an unfolded protein response. As detailed in the following sections, these processes can reinforce each other, such that metabolic alterations and pro-inflammatory responses could manifest as adaptations to increased cell proliferation, protein synthesis, or even be an additional source of stress, such as perturbations in the mitochondria. Altogether these findings are consistent with the increased proliferative capacity that we previously described for these astrocytes (Diaz-Amarilla et al. 2022).

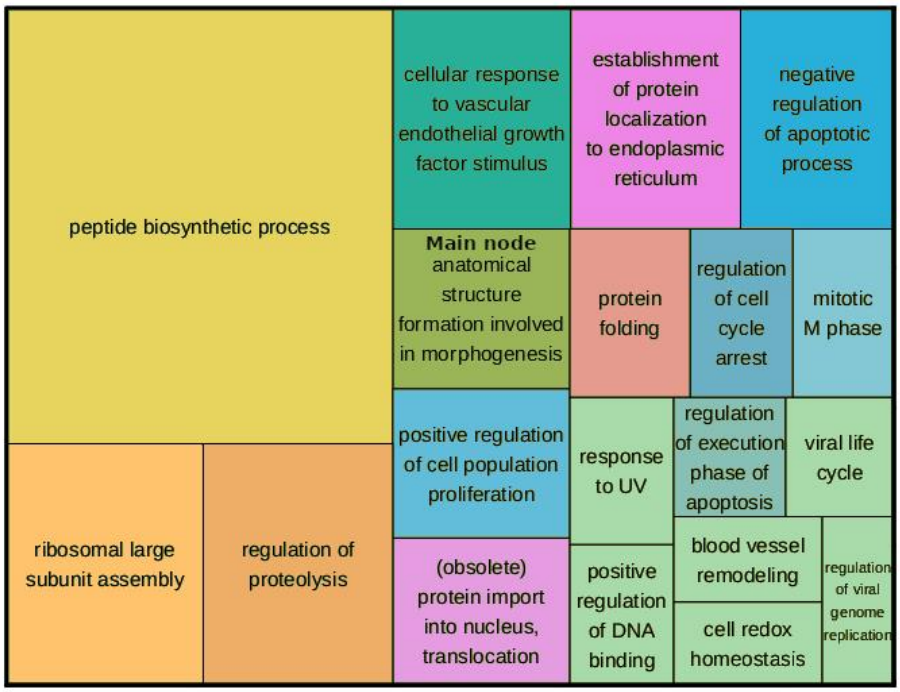


Fig. 7 Enriched GO terms associated with up-regulated transcripts in Tg.Old astrocytes. Only main node is presented, see full schematic in Online Resource 1, Fig. S8. Each rectangle is a representative of a single group of

GO terms, which are then associated into 'superclusters' and displayed in different colors. The size of the rectangles is adjusted to reflect the p-value

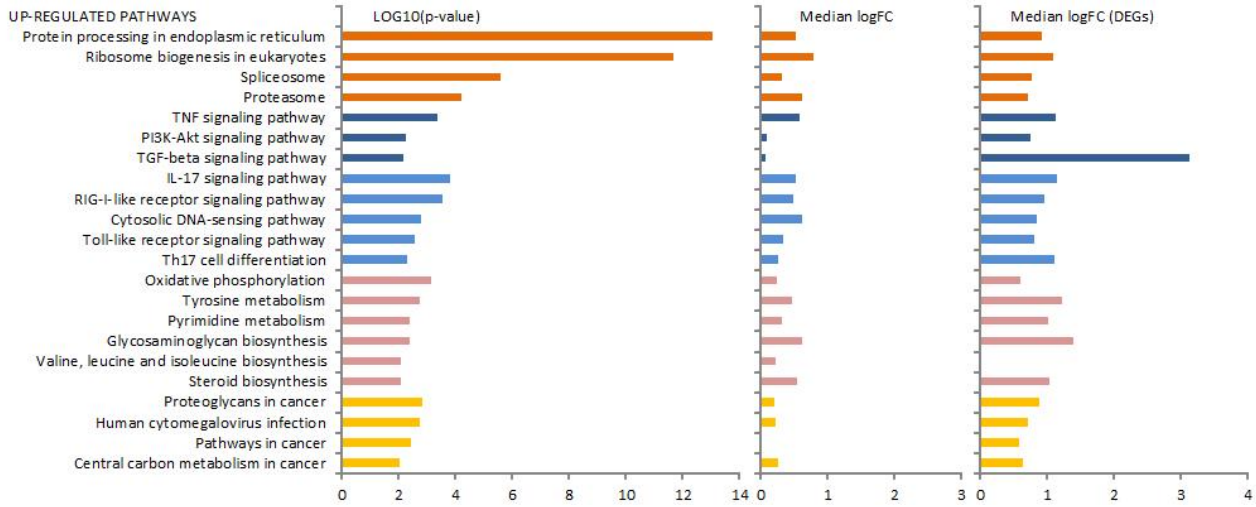


Fig. 8 Enriched KEGG pathways derived from up-regulated transcripts in Tg.Old astrocytes. Pathways are organized according to KEGG class; pathways in orange belong to the following classes: Transcription; Translation; Folding, sorting and degradation; blue: Signal transduction; Signaling molecules and interaction; light blue: Organismal Systems (Immune system); purple: Metabolism; and yellow: Human diseases. For brevity only the most representative pathways inside each group are included. See Online Resource 2 for the full list and analysis of pathway overlap. Log10(p-value) takes de minimum p-value among GAGE, camera and goana results, Median logFC considers de median log fold change of all the genes detected in the pathway, Median logFC (DEGs) is restricted to differentially expressed genes (DEGs). The total number of DEGs involved in up-regulated pathways is 803 (567 up), with a median fold change of 0.92

3.3.1. Transcriptional alterations associated with pro-inflammatory and proliferative features

As indicated from the pathway analysis and reactivity markers evaluated, Tg.Old astrocytes show a pro-inflammatory and proliferative profile (Fig. 4 and Fig. 8). In addition to previously identified enzymes such as Ptgs2 and Nos2, Tg.Old astrocytes show transcriptional alterations associated with other proinflammatory proteins such as Pla2g4a, recently described as part of a pan-injury astrocyte response (Viejo et al. 2021). Moreover, transcriptomics results suggest the alteration of various cell adhesion molecules, growth factors and trophins, cytokines, matrix metalloproteases as well as transcription factors such as p65 (Rela, Nuclear Factor- kappa-B p65 subunit) that have a prominent role in regulating neuroinflammation, proliferation and related metabolic adaptations. These alterations illustrate both protective and harmful roles of astrocyte reactivity. For example cytosolic phospholipase A2 (Pla2g4a, cPLA2) activity has important roles in health and disease (Leslie 2015). It catalyzes the hydrolysis of membrane phospholipids to release arachidonic acid which is subsequently metabolized into eicosanoids (Leslie 2015). Expression of this enzyme in astrocytes has been associated with harmful pro-inflammatory effects in mouse models (Chao et al. 2019).

Altered cytokine profiles (Fig. 9) have been previously associated with astrocyte reactivity in AD including interleukin-6 (Il-6), interleukin-33 (Il-33), C–C motif chemokine ligand 2 (Ccl2), and stromal cell-

derived factor 1 (Cxcl12) (Viejo et al. 2021). These cytokines can promote beneficial effects such as Il-34 and Il-33, dual or even harmful effects like Il6 and Ccl11 depending on the disease context. Il-6 for example is one of the most well-known mediators of astrocyte inflammatory processes and has been implicated in protective but also in harmful effects like promotion of neuronal death and deregulation of synapse formation (Wei et al. 2012; Hou et al. 2016; Kummer et al. 2021). Chemokine Ccl11 is a potent eosinophil chemoattractant in the peripheral immune system and has also been found associated with neuroinflammation and neurodegeneration, even though the evidence is conflicting. Ccl11 levels in plasma and CSF increase with aging even though in AD patients it has only been found increased in plasma and in ALS patients is correlated with slow disease progression (Villeda et al. 2011; Leung et al. 2013; Furukawa et al. 2015; Cherry et al. 2017; Sirivichayakul et al. 2018). Studies in a transgenic AD mouse model, mouse neuronal cultures and microglia-neuronal co-cultures suggest that Ccl11 could promote neurodegeneration activating Gsk-3β as well as induce microglia to produce reactive oxygen species and neurotoxicity (Parajuli et al. 2015; Zhu et al. 2016).

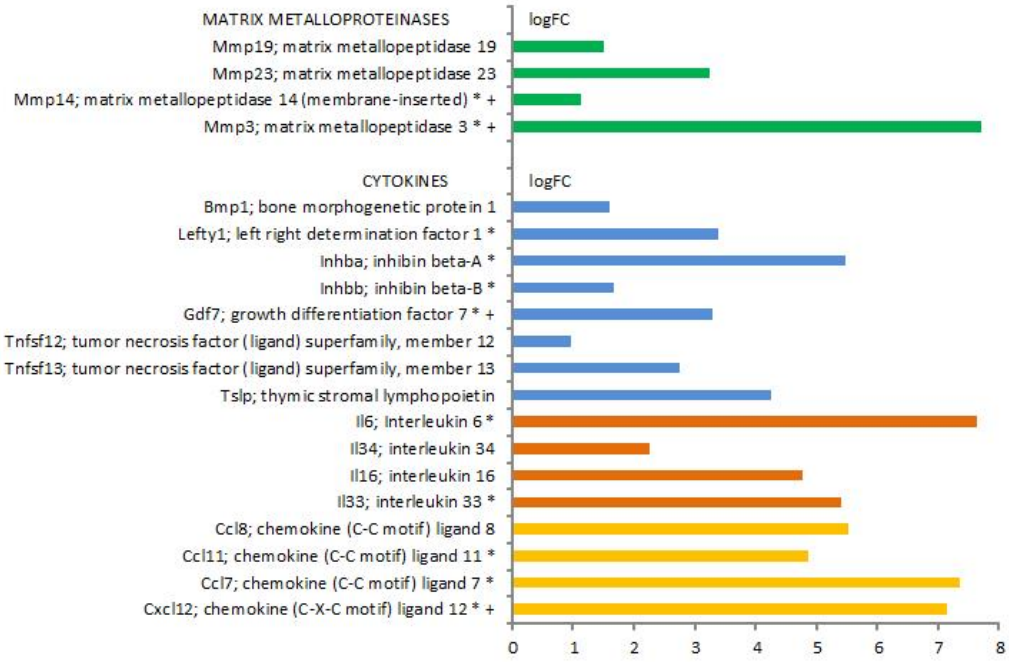


Fig. 9 Up-regulated cytokines and matrix metalloproteinases examples in Tg.Old astrocytes. * indicate factors involved in up-regulated KEGG pathways, + indicate factors involved in down-regulated KEGG pathways. Up-regulated pathways include “Pathways in cancer”, “PI3K-Akt signaling pathway”, “TNF signaling pathway”, and “IL-17 signaling pathway” among others. Down-regulated pathways include “Axon guidance”, “Calcium signaling pathway”, and “cAMP signaling pathway”. q-value for Interleukin 6 is 0.0506, considering its functional importance it was also included

Alternatively evidence regarding other factors like Il-34, Il-33 and Cxcl12 illustrates a protective or counterbalancing role of reactive astrocytes in neurodegeneration. For example Il-34 is associated with neuroprotective effects *in vitro* by regulating microglia phenotype (Mizuno et al. 2011; Ma et al. 2012). Similarly, Il-33, initially described as a cellular alarmin released after tissue damage, is involved in

synapse refinement by microglia and in the regulation of immune responses (Liew et al. 2016; Vainchtein et al. 2018). Moreover, it has a role in injury healing and has been found neuroprotective in multiple models by regulating microglia and astrocyte phenotype (Gadani et al. 2015; Fu et al. 2016; Yang et al. 2017; Carlock et al. 2017; Chen et al. 2019c). Genetic and transcriptional deficiencies of Il-33 have been associated with AD (Chapuis et al. 2009). Similarly, Il-33 deficiency can cause tau abnormality, neurodegeneration, and AD-like symptoms in aged mice and Il-33 administration can reduce Abeta load and plaque formation as well as improve synapse plasticity and cognitive symptoms (Fu et al. 2016; Carlock et al. 2017). Even though, Il-33 activity also appears to facilitate glioma cell proliferation and migration through up-regulation of Mmp2 and Mmp9 via NF-κB signaling (Zhang et al. 2017). Cxcl12 plays a fundamental role in neurogenesis, axon guidance, neurite outgrowth, and synapse regulation, in addition to being reactivated after brain inflammation or injury (reviewed in (Guyon 2014)). *In vitro* it promotes astrocyte proliferation (Bonavia et al. 2003). Reduced levels have been found in AD patients and mouse models of the disease (Parachikova and Cotman 2007; Laske et al. 2008). Beneficial effects have also been reported in mouse models (Shin et al. 2011; Raman et al. 2011; Wang et al. 2012; Capsoni et al. 2017). Cxcl12 expression can be up-regulated by HIF-1α, being associated with tumor growth (De Falco et al. 2004).

Release of trophic factors and regulation of extracellular matrix (ECM) are part of normal astrocyte function and reaction, specifically affecting proliferation, neuronal support, synapsis formation and axon growth, as well as tissue reconstitution and scar formation. In this sense, when compared respect to control, transcripts of various matrix metalloproteinases (MMPs) are altered in Tg.Old astrocytes (Fig. 9). MMP are a group of proteases capable of processing ECM components and other proteins, contributing to wound healing, angiogenesis and regulation of BBB permeability, among other processes (Löffek et al. 2011; Rempe et al. 2016). Evidence regarding their role in AD shows that even though they may help to degrade Abeta and reduce its deposit, they could also participate in the amyloidogenic pathway, promote harmful inflammatory process, neuronal loss, axonal damage and dysfunction of the BBB (Paumier et al. 2019; Rivera et al. 2019). Mmp3 for example is associated with both beneficial functions and harmful effects like contributing to synapse plasticity or apoptosis (Kim and Hwang 2011; Hove et al. 2012). In addition to MMPs, transcripts coding members of other protease families were found up-regulated, such as Adam12, Adam19 and Bmp1. Noteworthy, Adam12 protein levels have been found reduced in AD even though its proteolytic activity might be increased and *in vitro* evidence indicates that it may mediates toxic effects of Abeta (Malinin et al. 2005).

Furthermore, transcripts coding multiple ECM proteins are found altered in neurotoxic astrocytes including collagen (Col1a1, Col1a2), laminin (Lamb1, Lama4), and integrin (Itgb1, Itgb3, Itgb7, Iga10) forms. See Fig. 10 for an example list of growth factors and ECM proteins whose transcripts are up-regulated by neurotoxic astrocytes. These adhesion molecules can be up-regulated in reaction processes and intervene in axonal growth and scar formation (Wiksten et al. 2007; Lei et al. 2012; Wang et al. 2015; Neo and Tang 2017). Particular functions suggested by the altered transcripts include proliferation (Itgb1), neurogenesis (syndecan-1), BBB repair (thrombospondin 2) and anti-inflammation (Cd47, Efemp1 and galectin-1) (Qu et al. 2010, 2011; Tian et al. 2011; Starossom et al. 2012; Wang et al. 2015; Thorén et al. 2019; Mouthon et al. 2020; Gheibihayat et al. 2021).

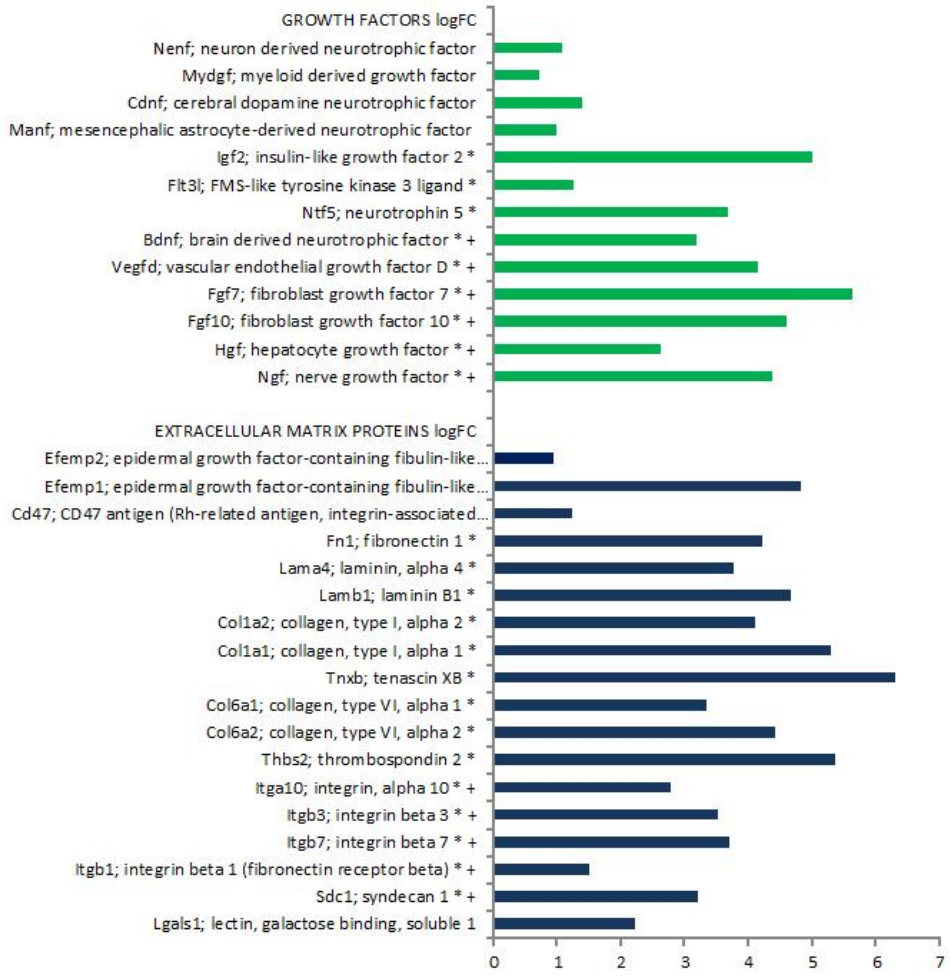


Fig. 10 Up-regulated growth factors, extracellular matrix and related proteins examples in Tg.Old astrocytes. * indicate factors involved in up-regulated KEGG pathways, + indicate factors involved in down-regulated KEGG pathways. Up-regulated pathways include “Pathways in cancer”, “PI3K-Akt signaling pathway”, “TNF signaling pathway”, and “IL-17 signaling pathway” among others. Down-regulated pathways include “Axon guidance”, “Calcium signaling pathway”, and “cAMP signaling pathway”

Released growth factors like Igf1, Hgf, Vegf, and Fgf can have neuroprotective effects or promote the proliferation of astrocytes and other cells (Beilharz et al. 1998; Madathil et al. 2013; Pitt et al. 2017; Calvo et al. 2018; Savchenko et al. 2019; Chen et al. 2019b; Desole et al. 2021). Alteration of the corresponding transcripts is consistent with our previous observations regarding an increased proliferative capacity but also suggest that old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes conserve some neurotrophic effects (Diaz-Amarilla et al. 2022). For example Manf is a neurotrophin with a role in neuronal differentiation (Tseng et al. 2017, 2018) that can also be secreted in response to injury and/or cellular stress showing protective functions such as down-regulation of NF-kB dependent inflammatory responses (reviewed in (Pöyhönen et al. 2019) and (Linnerbauer and Rothhammer 2020)). On the contrary, Bdnf and Ngf can promote in some contexts detrimental effects on neurons. Astrocytes up-regulate Bdnf in response to injury and other cellular stresses (Dougherty et al. 2000; Qu et al. 2010; Fulmer et al. 2014). Bdnf signaling though TrkB receptors has been shown to promote neuronal survival

and neurite outgrowth while signaling through p75NTR receptors can induce apoptosis in cultured neurons (Lee et al. 2001; Arévalo and Wu 2006; Cragnolini and Friedman 2008). Nonetheless Bdnf can promote astrocyte reactivity and microglia activation, as well as secretion of excessive nitric oxide (NO), Tnf-α and Il1-β contributing to harmful neuroinflammation (Colombo et al. 2012; Ding et al. 2020; Jeon et al. 2020). A similar behavior is displayed by Ngf. Transcriptional or protein up-regulation of Ngf is observed in injury, ischemia, Parkinson's disease models (Lee et al. 1998; Goss et al. 1998; Nakagawa and Schwartz 2004). Remarkably, imbalance of Ngf signaling through TrkA and p75NTR receptors has been associated with Alzheimer's disease and other disorders (Tiveron et al. 2013; Mysona et al. 2015; Fahnestock and Shekari 2019). For instance, pro-Ngf has a higher affinity to p75NTR which can induce neuronal and oligodendrocyte apoptosis (Beattie et al. 2002; Marchetti et al. 2019). Particularly, pro-Ngf appears to be associated with astrocyte reactivity in spinal cord injury and neuronal death after exposure to reactive astrocyte conditioned media (Domeniconi et al. 2007; Cheng et al. 2020).

3.3.2. Transcriptional alterations associated with biosynthetic and energy metabolism

Transcriptomics data suggest alterations in old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes energy metabolism, including glycolysis, pentose phosphate pathway (PPP), TCA cycle and mitochondrial activity. Glucose enters the cell though specific glucose transporters (Glut1), and is phosphorylated by hexokinase (and glucokinase) to produce glucose-6-phosphate (G6P), a common precursor of glycolysis for energy and lactate production and of the pentose–phosphate pathway (PPP) (Bélanger et al. 2011). The PPP is a fundamental component of cellular metabolism, necessary for carbon homeostasis, synthesis of nucleotide, amino acid precursors and reducing factors for anabolism and regulation of oxidative stress (Stincone et al. 2015). The rate-limiting step in glycolysis is catalyzed by 6-phosphofructokinase (Pfk1) and in PPP activity by glucose-6- phosphate dehydrogenase (G6pd). Glucose entrance steps do not appear to be altered in Tg.Old astrocytes. Even though some glucose transporters isoforms are down-regulated, Glut1 transcript (Slc2a1) is not altered, as well as transcripts coding some glycolysis enzymes, such as hexokinase and glucokinase (Hk1, Hk2, Hk3, Gck). Subsequent steps of this route suggest a relative shift from glycolysis to PPP. Glycolysis branch might be reduced as two Pfk1 subunit transcripts (Pfkm and Pfkp) are down-regulated (Pfkl is not altered). In the PPP branch, G6pd presents two isoform transcripts, being H6pd up-regulated. Noteworthy in cancer cells Pfk1 inhibition drives PPP flux and supports cell growth (Yi et al. 2012). Another important alteration suggesting the same shift is the down-regulation of Pfkfb3 transcript. Pfkfb3 suppression increases the flux through PPP to foster cell defense and repair mechanisms (Stincone et al. 2015; Franklin et al. 2016). As indicated previously these alterations allow cell survival under metabolic stress and are commonly found in malignant cells. Snail (Snai1) appears to be one of the transcription factors involved in this metabolic shift and its transcript is up-regulated in neurotoxic astrocytes (Kim et al. 2017).

Mitochondrial oxidative phosphorylation is one of the main cellular sources of ATP. In this process ATP synthesis at the FOF1-ATP synthase (complex V or CV) is coupled to the transport of electrons through the electron transport chain (ETC), constituted by a series of multimeric enzymes (Complexes I to IV or CI-CIV) and two electron carriers (coenzyme Q and cytochrome c) located at the inner mitochondrial membrane (Zhao et al. 2019; Tang et al. 2020; Gonzalez-Franquesa et al. 2021). Mitochondrial dysfunction including impairment of the ETC complexes or of the ATP synthase leads to reduced ATP

production, Ca^{2+} dyshomeostasis, and ROS generation being one of the contributing factors of AD (Wang et al. 2020b). Particularly, in the 3xTg-AD mouse model, decline in mitochondrial respiration and enzymes required for bioenergetics in the brain can be observed at 3 month of age (Yao et al. 2009; Adlimoghaddam et al. 2019). Mitochondrial dysfunction can also impair astrocyte function (Fiebig et al. 2019; Bantle et al. 2021). Energy production in astrocytes is largely based on mitochondrial oxidative metabolism, even though they can remarkably increase their glycolytic and glycogenolytic metabolism in response to neuronal activity (Hertz et al. 2007). In the present work we observed that old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes present numerous transcript alterations of mitochondrial complexes illustrating a complex scenario (Fig. 11). Complementary information was assessed by western blot analysis using an antibody cocktail directed to specific mitochondrial complex subunits, as an approach to confirm transcriptomic alterations at the mitochondrial level found in Tg.Old astrocytes. For complex I (CI), catalytic subunit transcripts do not show differential expression but transcripts coding a few accessory subunits are altered. Ndufa5 subunit transcript is up-regulated, pointing towards an increase in efficiency of CI activity (Chadwick et al. 2011). Contrarily, alteration trends in the expression of accessory subunit transcripts Ndufc2 and Ndufa4l2 suggest a reduction of CI activity (Sekar et al. 2015; Rubattu et al. 2016; Raffa et al. 2019; Forte et al. 2020; Chen et al. 2021). Noteworthy, overexpression of Ndufa4l2 was observed in AD astrocytes (Sekar et al. 2015) as well as in glioblastoma (Chen et al. 2021). Similarly, a trend towards down-regulation of the accessory CI subunit Ndufb8 (not significant) was observed by western blot (Fig. 11). Taken together, down-regulation of these accessory subunits suggest a minor decrease in CI activity but a compensatory role of the other subunits cannot be discarded.

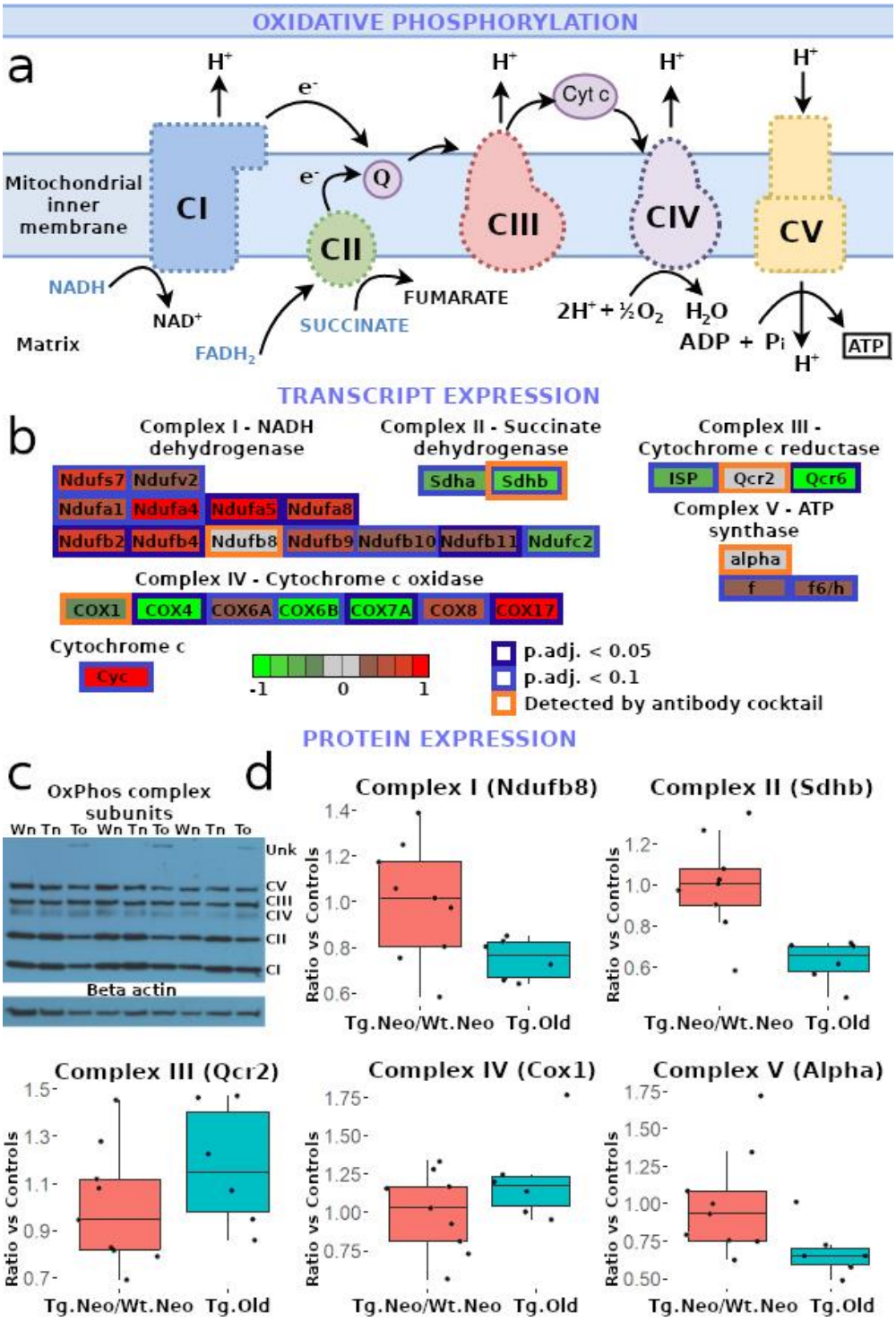


Fig. 11 Transcript and protein expression of oxidative phosphorylation complexes in Tg.Old astrocytes. (**a**) Oxidative phosphorylation schematic (created with diagrams.net and Gimp tools). (**b**) Transcript color map adapted from KEGG (mmu00190). Differentially expressed subunits with a strict (p.adj < 0.05) and a lenient criteria (p.adj <0.1) are depicted, as well as subunits detected at the protein level. (**c**) Example western blot scan. Protein expression of different mitochondrial complex subunits was assessed by western blot using an antibody cocktail. In old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes an additional band (Unk) was detected at high molecular weight (~135 kDa). (**d**)

Individual protein expression plots. A lenient approach was followed to detect trends in the protein expression: Tg.Old (To) group samples were compared against control samples Tg.Neo (Tn) and Wt.Neo (Wn) joined as a single group, values were normalized against Beta actin expression and additionally by the average expression of controls from each assay (Ratio). Under this approach trends in the alteration of subunits from the following complexes were observed: CI (p.adj = 0.07), CII (p.adj = 0.005) and CV (p.adj = 0.04) (Wilcoxon test)

Complex II (CII) is also a component of the TCA cycle where it catalyzes oxidation of succinate to fumarate, while in the ETC facilitates electron transfer from flavin adenine nucleotide (FAD) to electron carrier ubiquinol (Zhao et al. 2019; Tang et al. 2020). CII down-regulation has been associated with AD (Patro et al. 2021) and senescent process in-vitro (Yoon et al. 2003). At the transcriptomics level we observed a trend towards down-regulation of catalytic subunits Sdha and Sdhb, the latter being consistent with protein expression (Fig. 11). These evidences indicate a deficiency in CII activity in old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes.

In the case of complex III (CIII), some contradictory trends are observed. At the protein level, the metal binding subunit Qcr2 (Uqcrc2) is not altered (trends to be up-regulated), while the transcript of catalytic subunit ISP/Rieske (Uqcrfs1) trends to be down-regulated suggesting a deficiency of this complex. Qcr6 transcript coding a structural and regulatory subunit is also down-regulated. Complex IV (CIV) shows a similar behavior. Metal binding subunit Cox1 is not altered at the protein or transcript level. Transcripts Cox6a1 and Cox8a of catalytic subunits trend to be up-regulated. Fine tuning of alternative isoforms of Cox4 and Cox7a is also observed but these alterations would not necessarily translate into loss of CIV activity. Alteration of transcripts coding other structural and regulatory subunits like Cox6b2 and chaperone Cox17 suggests a reorganization of CIII as discussed below.

Regarding complex V (CV), transcript Atp5a1 coding the alpha subunit (catalytic) is not altered but the corresponding protein appears to be down-regulated suggesting a diminished mitochondrial capacity to produce ATP. Down-regulation of this subunit has been associated with cancer progression (Zhang et al. 2021). Another important alteration observed is the up-regulation of cytochrome c transcript. Cytochrome c serves as an electron carrier between CIII and CIV of the ETC, as a ROS scavenger and in initiation of apoptosis once it leaks from mitochondria into the cytosol (Wenzel et al. 2019). Recently it has been found that it can act extracellularly and modulate astrocyte functions through toll-like receptor 4 (Wenzel et al. 2019).

Beyond individual mitochondrial complex activity, global arrangement of the ETC adds another layer of regulation. Current evidences indicate that ETC complexes can be organized freely in the membrane or assemble into supramolecular structures known as supercomplexes (SCs). In particular, functional arrangements of CI-III-IV called “respirasomes” have been confirmed (Acín-Pérez et al. 2008). CII appears to not be involved in supercomplex formation but it might have a regulatory role (Jang and Javadov 2018). Supercomplex arrangements are thought to improve control of ROS production, maintain the structural integrity of ETC complexes (assisting for example CI assembly and stability), and prevent protein aggregation in the inner mitochondrial membranes (Acín-Pérez et al. 2008; Genova and Lenaz 2014) (reviewed in (Lobo-Jarne et al. 2020)). In the CNS these arrangements contribute to the metabolic specialization of different cell types. In contrast with neurons, astrocytes appear to have

higher levels of free CI than assembled into super complexes, which might be associated with increased ROS production in astrocytes (Lopez-Fabuel et al. 2016). Transcripts of some important subunits involved in supercomplex formation appear to be altered in old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes, including CI subunits Ndufb4 (up-regulated) and Ndufb9 (trend to be up-regulated), CIII subunits Rieske (Uqcrfs1) (trend to be down-regulated) and Qcr6 (Uqcrh) (down-regulated), as well as various isoforms of CIV subunit Cox7a (Schägger 2002; Garone et al. 2018). Remarkably interchange between Cox7a2l, Cox7a1 and Cox7a2 isoforms could potentially determine whether CIV stays as a monomer, forms oligomers or associates with CIII (Garone et al. 2018). Interestingly western blot analysis detected an additional band at high molecular weight (~135 kDa) only in Tg.Old samples that could relate to the formation of supercomplex arrangements. Further analyses are needed to confirm the existence of these alterations and its impact on mitochondrial activity. Furthermore, in some studies it has been observed that important reductions of activity of CI, CIII and CIV (greater than 70%) were necessary to produce a significant decrease in ATP production, so a mild impairment in the ETC complexes might not be sufficient to cause bioenergetics impairment as seen in AD brain (Letellier et al. 1994; Barrientos and Moraes 1999).

The tricarboxylic acid cycle (TCA) which supplies the ETC with reduced factors NADH and FADH can be another source of alterations (Zhou et al. 2018). Cytoplasmic metabolites to sustain TCA function are provided from either a canonical oxidative pathway or anaplerotic pathways. The canonical oxidation pathway is a continuation from glycolysis, where pyruvate enters the TCA as acetyl-CoA, carried out by pyruvate dehydrogenase complex (Pdh), a key rate-limiting enzyme (Zhou et al. 2018). Deficiency of TCA enzymes pyruvate dehydrogenase, and alpha-ketoglutarate dehydrogenase appear to be present in AD (Sorbi et al. 1983; Gibson et al. 2012). Compromised Pdh function has also been observed in 3xTg-AD neurons and leads to a deficit in acetyl-CoA, and subsequent decrease of OxPhos activity (Yao et al. 2009). Transcripts corresponding to the main catalytic subunits of the pyruvate dehydrogenase complex are not found altered in old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes, but the regulatory subunit Pdp1 (pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 1) appears to be down-regulated. The anaplerotic pathways involve metabolic enzymes such as pyruvate carboxylase (Pcx), phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pck1, Pck2), malic enzyme (Me1, Me2, Me3), glutaminase (Gls) and glutamate dehydrogenase (Glud1, Glud2). Even though anaplerotic pathways are thought to not contribute to ATP production directly, some studies have suggested that glutamine supports NADH production from the Gls/Glud anaplerotic pathway similarly to the canonical pathway (Reitzer et al. 1979; Le et al. 2012). While Pcx transcript is down-regulated, Gls transcript appears to be up-regulated suggesting that old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes have an increased use of glutamine as a carbon source compared with neonatal astrocytes.

Finally, perhaps the clearest perturbation observed in old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes involves activity at the endoplasmic reticulum and the stress responses that emerge from it (see simplified scheme in Fig. 12). Disruption of ER homeostasis, such as accumulation of misfolded proteins in the ER lumen can trigger an adaptive mechanism named the unfolded protein response (UPR) resulting for example in reduced protein synthesis, increased protein clearance and chaperone expression (Schmitz et al. 2018; Ghemrawi et al. 2018; Zhang et al. 2020b). A transcriptional alteration of various elements

directly associated with the canonical UPR like Grp78 (Hspa5), Ire1α, and Atf4 or its regulation such as Creb3l1 can be observed suggesting some level of ER stress occurring in the old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes (Kondo et al. 2005; Schmitz et al. 2018; Ghemrawi et al. 2018; Zhang et al. 2020b). Noteworthy, transcription factor Atf4 ties these alterations with subsequent metabolic changes like aminoacid metabolism. Many enzymes and transporters related to amino acid and central carbon metabolism are altered, like Adh1, Adh7, Aldh3a1, Fah, Got1, Got2, Maoa, Aoc2, Cad, Nos2, Ldha, Slc1a5, Slc7a, Enpp1 and B4galt1. Another remarkable alteration is the enzyme Gls, a central hub of brain metabolism. The shift of these metabolisms could have detrimental effects on neuronal homeostasis by lack of support or be directly neurotoxic through excessive liberation of glutamate.

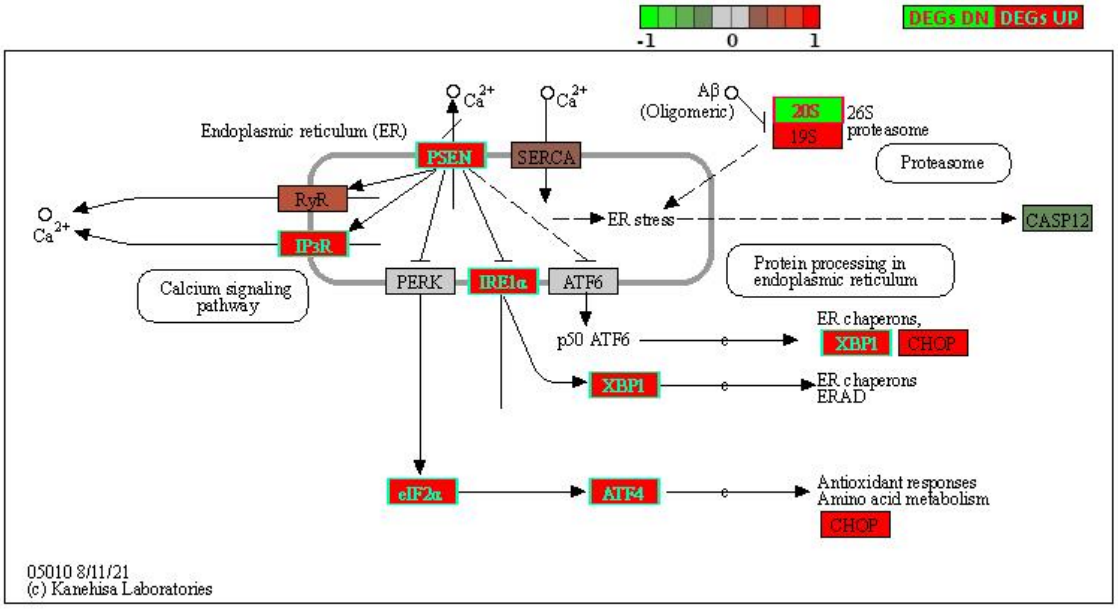


Fig. 12 Signaling related to protein processing in the endoplasmic reticulum. Simplified excerpt taken from "Alzheimer's disease" KEGG colored map (mmu05010). Color pattern expressed according to the observed logFC in Tg.Old astrocytes. Nodes corresponding to DEGs were highlighted

Endoplasmic reticulum and mitochondrial stress responses as well as inflammatory pathways and metabolic derangements are mutually regulated and converge through few major transcription factors (Hotamisligil 2010; Salvadó et al. 2015; Martin-Jiménez et al. 2017; Schmitz et al. 2018; Ghemrawi et al. 2018). Beyond its protective role (Cissé et al. 2016; Wang et al. 2018), prolonged ER stress can result in harmful inflammation and cell death which contribute to the progression of various diseases including cancer, diabetes and neurodegenerative diseases (Duran-Aniotz et al. 2017; Martin-Jiménez et al. 2017; Schmitz et al. 2018). In particular, astrocytic ER appears to be an element linking metabolic and neurological diseases and has been associated with a distinct reactivity state that alters the astrocytic secretome, leading to loss of synaptogenic function *in vitro* and harmful effects *in vivo* (Martin-Jiménez et al. 2017; Smith et al. 2020). Similarly to metabolic diseases (Contreras et al. 2014), ceramide activation in astrocytes can promote pro-inflammatory responses, increased ROS and ER stress which could contribute to the progression of neurodegenerative diseases (Prasad et al. 2008; de la Monte et al. 2012; Gu et al. 2013).

Other important feature associated with the ER stress response involves the transcription factors Hif-1α and c-Myc. An observed transcriptional up-regulation of Hif-1α and c-Myc is consistent with previous findings and represent possible self-preserving adaptations of old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes. Under hypoxic conditions and ER stress Hif-1α activity increases glucose uptake, and controls its flux through the glycolytic and pentose phosphate pathways, protecting neuronal cells and increasing cancer survival (Soucek et al. 2003; Chen et al. 2014; Lõpez-Hernández et al. 2015). Hif-1α is also associated with a shift in the expression of Ldh isoforms, observed in the transcriptomics profile, and that can reduce the usage of lactate as a fuel source in mitochondrial respiration and favor aerobic glycolysis (Papandreou et al. 2006). Similarly c-Myc gene can also be stimulated by ER stress response, and enhance proliferation, glycolysis, glutathione biosynthesis from glutamine and glutaminolysis (Le et al. 2012; Miller et al. 2012; Hart et al. 2012; Goetzman and Prochownik 2018).

3.3.3. Transcriptional alterations associated with senescence-like features

Cellular senescence is a key feature of aging that contributes to tissue dysfunction (Baker et al. 2016; Kritsilis et al. 2018). Typically it involves permanent cell cycle arrest and resistance to apoptotic cell death dependent on the activity of p16ink4a and p53-p21-Rb (retinoblastoma) (Kritsilis et al. 2018; Zhu et al. 2021). Senescent cells exhibit increased unfolded protein response (UPR), indicative of endoplasmic reticulum (ER) stress (Cormenier et al. 2018). Various metabolic alterations have been associated with cellular senescence including a shift from oxidative phosphorylation to glycolysis, up-regulation of tricarboxylic acid cycle, pentose phosphate pathway, and nucleotide synthesis pathways, as well as down-regulation of fatty acid synthesis and altered mitochondrial function (Lee et al. 2006; Correia-Melo et al. 2016; Wu et al. 2017; Weichhart 2018; Kritsilis et al. 2018). Senescent cells release an array of factors called the senescence-associated secretory phenotype (SASP) that can contribute to harmful effects, including pro-inflammatory cytokines, chemokines, growth hormones, angiogenic factors, and matrix metalloproteinases (Kritsilis et al. 2018; Zhu et al. 2021).

Cellular senescence could be a contributing factor of neurodegenerative diseases. Senescent cells accumulate in brain tissue with age showing a pro-inflammatory secretion pattern (Bhat et al. 2012; Jurk et al. 2012; Kritsilis et al. 2018). Mouse and cell culture models of neurodegeneration indicate that senescent glia and in particular senescent astrocytes can promote pathology (Bhat et al. 2012; Chinta et al. 2018; Bussian et al. 2018). Senescent and reactive marker profiles reported in the literature show a considerable overlap, and specific features that distinguish both states are not clear even though some candidate genes have been proposed *in vitro* (Cohen and Torres 2019; Simmnacher et al. 2020). In this sense, it can be speculated that astrocyte senescence may be a form or a consequence of astrocyte reactivity. This interpretation may well apply to the similarities found between neurodegeneration and cancer. Is cell-transformation just senescence gone wrong? Is senescence reactivity gone too far?

An array of senescent markers was gathered from literature sources and compared against transcriptomics data (Bhat et al. 2012; Crowe et al. 2016; Casella et al. 2019; Basisty et al. 2020a, b; González-Gualda et al. 2021) (see full list and references in Online Resource 2). As expected based on

the proliferative capacity of old 3xTg-AD neurotoxic astrocytes, some of the most typical senescence markers like β-galactosidase (Glb1), p16ink4a (Cdkn2a), lamin B1 (Lmnb1) and Vegfa were not differentially expressed, or expressed accordingly like Rb1 (down-regulated) but a concordant profile emerged from others, including p21 (Cdkn1a) and Trp53 (Fig. 13). Transcripts coding proteins typically associated with astrocyte reactivity and injury processes including fibronectin, Il6 and Kcnj10 were detected. Noteworthy, a down-regulation of Gfap, not typically expected in reactive astrocytes, matches a senescent profile. From the assessed profile other interesting factors emerge. Insulin-like growth factor binding protein 4 and 6 (Igfbp4, Igfbp46) are associated with neuronal differentiation and function. Igfbp6 has been found elevated in the serum of AD patients and is one of the factors that astrocytes can produce to inhibit neuronal differentiation *in vitro* (Tham et al. 1993; Barkho et al. 2006). Similarly Igfbp4 can inhibit proliferation and promotes differentiation of neural progenitor cells *in vitro* (Niu et al. 2017). Thioredoxin domain-containing protein 5 (Txndc5), biglycan (Bgn) and plasminogen activator (Plat) are associated with pro-inflammatory effects (Adhami et al. 2008; Li et al. 2013; Horna-Terrón et al. 2014; Wang et al. 2017; Xie et al. 2020). Plat can be expressed by astrocytes after injury *in vivo*, excessive activity inhibits dendritic arborization and induces cell death in developing Purkinje cells (Adhami et al. 2008; Li et al. 2013). Noteworthy some factors have also been associated with cancer progression in the CNS, including nucleophosmin 1 (Npm1), filamin C (Flnc) and lysyl oxidase 2 (Loxl2) (Holmberg Olausson et al. 2015; Kamil et al. 2019; Zhang et al. 2020a).

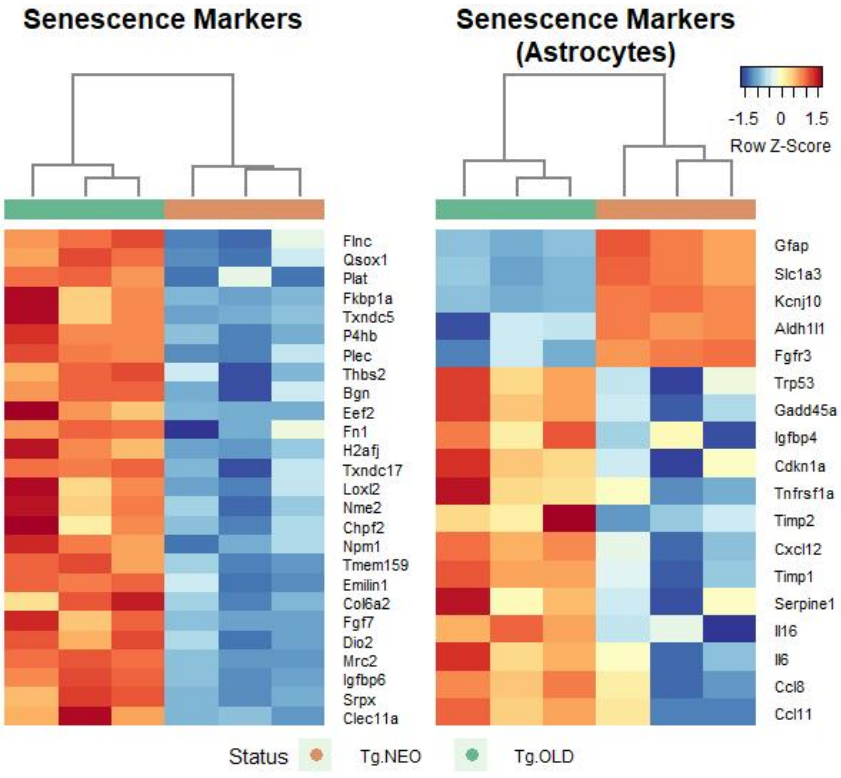


Fig. 13 Senescence markers in Tg.Old astrocytes. Markers were grouped in general senescence markers (left) and markers specifically identified in astrocytes (right). For general senescence markers only top up-regulated DEGs were considered (logFC > 1, p.adj < 0.01). Markers observed in astrocytes also include "negative" markers (expected to be down-regulated), which comprise the first down-regulated cluster. Considering its importance Il-6

was also included (p.adj = 0.0506). Marker and related proteins were gathered from literature sources (Bhat et al. 2012; Crowe et al. 2016; Casella et al. 2019; Basisty et al. 2020a, b; González-Gualda et al. 2021) (see full list and references in Online Resource 2)

4. Concluding remarks and perspectives

Neurotoxic astrocytes isolated from adult symptomatic 3xTg-AD mice showed multiple alterations associated with key regulatory processes, including energy metabolism, ion and neurotransmitter homeostasis, proliferation and inflammation. The assessed alterations reassert the potential role of transcription factors like c-Myc and NF-κB as drivers of Tg.Old phenotype, which have been extensively studied in many homeostatic and disease contexts (Granic et al. 2009; Miller et al. 2012; Goetzman and Prochownik 2018; Jha et al. 2019; Zhang et al. 2020b). Other emerging factors include estrogen receptors which are increasingly being associated with protective roles regulating inflammatory process and Hif-1α associated with both harmful and beneficial effects in the CNS as well as with cancer progression (Wang et al. 2016, 2020a; Ashok et al. 2017; Arias-Cavieres et al. 2020; Grubman et al. 2021).

Noteworthy, multiple alterations related to glucose and amino acid metabolism were suggested. The net effect of these alterations on glycolytic rates, mitochondrial function and aminoacid neurotransmitter homeostasis should be confirmed by functional assays.

Moreover, potential sources of neurotoxicity have been described among altered cytokine and growth factors. Finally, altered metabolism in the endoplasmic reticulum and mitochondrial could be a source of harmful metabolites like certain ceramides and fatty acids. In this regard, astrocyte release of saturated lipids have been recently reported as a neurotoxic mechanism (Guttenplan et al. 2021).

Remarkably, the observed profile is reminiscent of the behavior of transformed and senescent cells, pointing towards a common ground between metabolic disorders, neurodegenerative diseases and cancer as other authors have suggested based on molecular and population studies (Sánchez-Valle et al. 2017; Martin-Jiménez et al. 2017). In this sense some of the observed alterations might constitute a mechanism to counterbalance stress responses and promote proliferation: while in malignant cells it results in increased aggressiveness, in reactive astrocytes and other glial cells it can be initially protective. In a later disease stage, these alterations could impair astrocyte neuronal supporting role and instead, induce their neurotoxic potential in a self-sustained process.

Finally, an important caveat to note is that the lack of an age-matched control for the neurotoxic 3xTg-AD astrocytes prevents us from revealing the effect of aging as a separate factor in the development of this type of astrocyte, as well as the resulting effect of damage inflicted at the time of acquisition of an older brain. In this sense, in the present study we assess astrocytic changes originated from both age and disease progression but not from transgenesis *per se*. It is worth noting that further proof-of-causality studies are required to attribute the specific neurotoxic effects observed in old neurotoxic 3xTg-AD astrocytes to any of the molecular changes described. Likewise, our *in vitro* study opened exciting questions that should be further evaluated: Can these neurotoxic astrocytes be isolated from male 3xTg-AD mice whose pathology is less consistent than in females? If so, is their neurotoxic effect as

potent as in astrocytes isolated from female mice? What percentage of the total astrocytic population occupies *in vivo* this neurotoxic phenotype? In this sense, ongoing longitudinal studies in these mice (3 to 18 months) will provide complementary insights into this population of neurotoxic 3xTg-AD astrocytes and help us improve our understanding of astrocytic function throughout AD progression.

5. References

Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA (2008) Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. Mol Cell 32:529–539. https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2008.10.021

Acosta C, Anderson HD, Anderson CM (2017) Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. J Neurosci Res 95:2430–2447. https://doi.org/10.1002/JNR.24075

Adhami F, Yu D, Yin W, Schloemer A, Burns KA, Liao G, Degen JL, Chen J, Kuan C-Y (2008) Deleterious Effects of Plasminogen Activators in Neonatal Cerebral Hypoxia-Ischemia. Am J Pathol 172:1704–1716. https://doi.org/10.2353/AJPATH.2008.070979

Adlimoghaddam A, Snow WM, Stortz G, Perez C, Djordjevic J, Goertzen AL, Ko JH, Albensi BC (2019) Regional hypometabolism in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis 127:264–277. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2019.03.008

Al-Dalahmah O, Sosunov AA, Shaik A, Ofori K, Liu Y, Vonsattel JP, Adorjan I, Menon V, Goldman JE (2020) Single-nucleus RNA-seq identifies Huntington disease astrocyte states. Acta Neuropathol Commun 8:1–21. https://doi.org/10.1186/s40478-020-0880-6

Arévalo JC, Wu SH (2006) Neurotrophin signaling: many exciting surprises! Cell Mol Life Sci C 63:1523–1537. https://doi.org/10.1007/S00018-006-6010-1

Arias-Cavieres A, Khuu MA, Nwakudu CU, Barnard JE, Dalgin G, Garcia AJ (2020) A HIF1a-Dependent Pro-Oxidant State Disrupts Synaptic Plasticity and Impairs Spatial Memory in Response to Intermittent Hypoxia. eNeuro 7:1–12. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0024-20.2020

Ashok BS, Ajith TA, Sivanesan S (2017) Hypoxia-inducible factors as neuroprotective agent in Alzheimer's disease. Clin Exp Pharmacol Physiol 44:327–334. https://doi.org/10.1111/1440-1681.12717

Astakhova A, Chistyakov D, Thomas D, Geisslinger G, Brüne B, Sergeeva M, Namgaladze D (2019) Inhibitors of Oxidative Phosphorylation Modulate Astrocyte Inflammatory Responses through AMPK-Dependent Ptgs2 mRNA Stabilization. Cells 8:1185. https://doi.org/10.3390/CELLS8101185

Babenko VN, Smagin DA, Galyamina AG, Kovalenko IL, Kudryavtseva NN (2018) Altered Slc25 family gene expression as markers of mitochondrial dysfunction in brain regions under experimental mixed anxiety/depression-like disorder. BMC Neurosci 19:1–11. https://doi.org/10.1186/S12868-018-0480-6

Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, A. Saltness R, Jeganathan KB, Verzosa GC, Pezeshki A, Khazaie K, Miller JD, Van Deursen JM (2016) Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. Nature 530:184–189. https://doi.org/10.1038/nature16932

Bangsow T, Baumann E, Bangsow C, Jaeger MH, Pelzer B, Gruhn P, Wolf S, Von Melchner H, Stanimirovic DB (2008) The epithelial membrane protein 1 is a novel tight junction protein of the blood-brain barrier. J Cereb Blood Flow Metab 28:1249–1260. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.19

Bantle CM, Hirst WD, Weihofen A, Shlevkov E (2021) Mitochondrial Dysfunction in Astrocytes: A Role in Parkinson's Disease? Front Cell Dev Biol 8:1587. https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.608026

Barkho BZ, Song H, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH, Zhao X (2006) Identification of Astrocyte-expressed Factors That Modulate Neural Stem/Progenitor Cell Differentiation 15:407-421. doi: 10.1089/scd.2006.15.407

Barrientos A, Moraes CT (1999) Titrating the Effects of Mitochondrial Complex I Impairment in the Cell Physiology *. J Biol Chem 274:16188–16197. https://doi.org/10.1074/JBC.274.23.16188

Basisty N, Kale A, Jeon OH, Kuehnemann C, Payne T, Rao C, Holtz A, Shah S, Sharma V, Ferrucci L, Campisi J, Schilling B (2020a) A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. PLoS Biol 18:e3000599. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000599

Basisty N, Kale A, Patel S, Campisi J, Schilling B (2020b) The power of proteomics to monitor senescence-associated secretory phenotypes and beyond: toward clinical applications. Expert Rev. Proteomics 17:297–308. https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1766976

Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, Bresnahan JC, Hempstead BL, Yoon SO (2002) ProNGF Induces p75-Mediated Death of Oligodendrocytes following Spinal Cord Injury. Neuron 36:375–386. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01005-X

Beilharz EJ, Russo VC, Butler G, Baker NL, Connor B, Sirimanne ES, Dragunow M, Werther GA, Gluckman PD, Williams CE, Scheepens A (1998) Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic–ischemic injury. Mol Brain Res 59:119–134. https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00122-3

Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011) Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. Cell Metab 14:724–738. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2011.08.016

Belfiore R, Rodin A, Ferreira E, Velazquez R, Branca C, Caccamo A, Oddo S (2019) Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. Aging Cell 18:e12873. https://doi.org/10.1111/ACEL.12873

Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, Johnson FB, Trojanowski JQ, Sell C, Torres C (2012) Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer's Disease. PLoS One 7:e45069. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045069

Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S, Ochs SM, Hoffmann N, Mitteregger G, Kretzschmar H, Laferla FM, Herms J (2010) Multiple Events Lead to Dendritic Spine Loss in Triple Transgenic Alzheimer's Disease Mice. PLoS One 5:e15477. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0015477

Boisvert MM, Erikson GA, Shokhirev MN, Allen NJ (2018) The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain. Cell Rep 22:269–285. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.039

Bonavia R, Bajetto A, Barbero S, Pirani P, Florio T, Schettini G (2003) Chemokines and their receptors in the CNS: expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation. Toxicol Lett 139:181–189. https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00432-0

Boutros R, Byrne JA (2005) D53 (TPD52L1) is a cell cycle-regulated protein maximally expressed at the G2-M transition in breast cancer cells. Exp Cell Res 310:152–165. https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2005.07.009

Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ (2018) Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. Nature 562:578–582. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0543-y

Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. J Neurosci 28:264–278. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008

Calvo P, Pastor A, De La Cruz R (2018) Vascular endothelial growth factor: an essential neurotrophic factor for motoneurons? Neural Regen Res 13:1181. https://doi.org/10.4103/1673-5374.235024

Capsoni S, Malerba F, Carucci NM, Rizzi C, Criscuolo C, Origlia N, Calvello M, Viegi A, Meli G, Cattaneo A (2017) The chemokine CXCL12 mediates the anti-amyloidogenic action of painless human nerve growth factor. Brain 140:201–217. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWW271

Carlock C, Wu J, Shim J, Moreno-Gonzalez I, Pitcher MR, Hicks J, Suzuki A, Iwata J, Quevado J, Lou Y (2017) Interleukin33 deficiency causes tau abnormality and neurodegeneration with Alzheimer-like symptoms in aged mice. Transl Psychiatry 7:e1164–e1164. https://doi.org/10.1038/tp.2017.142

Carroll JC, Rosario ER, Kreimer S, Villamagna A, Gentzschein E, Stanczyk FZ, Pike CJ (2010) Sex differences in β-amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: Role of neonatal sex steroid hormone exposure. Brain Res 1366:233–245. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2010.10.009

Casella G, Munk R, Kim KM, Piao Y, De S, Abdelmohsen K, Gorospe M (2019) Transcriptome signature of cellular senescence. Nucleic Acids Res 47:7294–7305. https://doi.org/10.1093/nar/gkz555

Cassina P, Peluffo H, Pehar M, Martinez-Palma L, Ressia A, Beckman JS, Estévez AG, Barbeito L (2002) Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. J Neurosci Res 67:21–29. https://doi.org/10.1002/jnr.10107

Chadwick W, Boyle JP, Zhou Y, Wang L, Park SS, Martin B, Wang R, Becker KG, Wood WH, Zhang Y, Peers C, Maudsley S (2011) Multiple Oxygen Tension Environments Reveal Diverse Patterns of Transcriptional Regulation in Primary Astrocytes. PLoS One 6:e21638. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0021638

Chai H, Diaz-Castro B, Shigetomi E, Monte E, Octeau JC, Yu X, Cohn W, Rajendran PS, Vondriska TM, Whitelegge JP, Coppola G, Khakh BS (2017) Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. Neuron 95:531-549.e9. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2017.06.029

Chao CC, Gutiérrez-Vázquez C, Rothhammer V, et al (2019) Metabolic Control of Astrocyte Pathogenic Activity via cPLA2-MAVS. Cell 179:1483-1498.e22. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.11.016

Chapuis J, Hot D, Hansmannel F, et al (2009) Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. Mol Psychiatry 14:1004–1016. https://doi.org/10.1038/mp.2009.10

Chen L, Lin L, Xian N, Zheng Z (2019a) Annexin A2 regulates glioma cell proliferation through the STAT3-cyclin D1 pathway. Oncol Rep 42:399–413. https://doi.org/10.3892/OR.2019.7155

Chen W, He B, Tong W, Zeng J, Zheng P (2019b) Astrocytic insulin-like growth factor-1 protects neurons against excitotoxicity. Front Cell Neurosci 13:298. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00298

Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q, et al (2014) XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1α pathway. Nature 508:103–107. https://doi.org/10.1038/nature13119

Chen Y, Lun ATL, Smyth GK (2016) From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. F1000Research 5:1438. https://doi.org/10.12688/f1000research.8987.2

Chen Z, Wei X, Wang X, Zheng X, Chang B, Shen L, Zhu H, Yang M, Li S, Zheng X (2021) NDUFA4L2 promotes glioblastoma progression, is associated with poor survival, and can be effectively targeted by apatinib. Cell Death Dis 12:377. https://doi.org/10.1038/s41419-021-03646-3

Chen Z, Xu N, Dai X, Zhao C, Wu X, Shankar S, Huang H, Wang Z (2019c) Interleukin-33 reduces neuronal damage and white matter injury via selective microglia M2 polarization after intracerebral hemorrhage in rats. Brain Res Bull 150:127–135. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2019.05.016

Cheng YY, Zhao HK, Chen LW, Yao XY, Wang YL, Huang ZW, Li GP, Wang Z, Chen BY (2020) Reactive astrocytes increase expression of proNGF in the mouse model of contused spinal cord injury. Neurosci Res 157:34–43. https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2019.07.007

Cherry JD, Stein TD, Tripodis Y, Alvarez VE, Huber BR, Au R, Kiernan PT, Daneshvar DH, Mez J, Solomon TM, Alosco ML, McKee AC (2017) CCL11 is increased in the CNS in chronic traumatic encephalopathy but not in Alzheimer's disease. PLoS One 12:e0185541. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0185541

Chinta SJ, Woods G, Demaria M, Rane A, Zou Y, McQuade A, Rajagopalan S, Limbad C, Madden DT, Campisi J, Andersen JK (2018) Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. Cell Rep 22:930–940. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.12.092

Chiquita S, Ribeiro M, Castelhano J, Oliveira F, Sereno J, Batista M, Abrunhosa A, Rodrigues-Neves AC, Carecho R, Baptista F, Gomes C, Moreira PI, Ambrósio AF, Castelo-Branco M (2019) A longitudinal multimodal in vivo molecular imaging study of the 3xTg-AD mouse model shows progressive early hippocampal and taurine loss. Hum Mol Genet 28:2174–2188. https://doi.org/10.1093/HMG/DDZ045

Cho JM, Shin Y-J, Park J-M, Kim J, Lee M-Y (2013) Characterization of nestin expression in astrocytes in the rat hippocampal CA1 region following transient forebrain ischemia. Anat Cell Biol 46:131–140. https://doi.org/10.5115/ACB.2013.46.2.131

Cissé M, Duplan E, Lorivel T, Dunys J, Bauer C, Meckler X, Gerakis Y, Lauritzen I, Checler F (2016) The transcription factor XBP1s restores hippocampal synaptic plasticity and memory by control of the Kalirin-7 pathway in Alzheimer model. Mol Psychiatry 22:1562–1575. https://doi.org/10.1038/mp.2016.152

Clarke LE, Liddelow SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. Proc Natl Acad Sci U S A 115:E1896–E1905. https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115

Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, McGaugh JL, LaFerla FM (2007) Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. Neurobiol Dis 28:76–82. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2007.06.013

Cohen J, Torres C (2019) Astrocyte senescence: Evidence and significance. Aging Cell 18:e12937. https://doi.org/10.1111/ACEL.12937

Colombo E, Cordiglieri C, Melli G, Newcombe J, Krumbholz M, Parada LF, Medico E, Hohlfeld R, Meinl E, Farina C (2012) Stimulation of the neurotrophin receptor trkb on astrocytes drives nitric oxide production and neurodegeneration. J Exp Med 209:521–535. https://doi.org/10.1084/JEM.20110698

Contreras C, González-García I, Martínez-Sánchez N, Seoane-Collazo P, Jacas J, Morgan DA, Serra D, Gallego R, Gonzalez F, Casals N, Nogueiras R, Rahmouni K, Diéguez C, López M (2014) Central Ceramide-Induced Hypothalamic Lipotoxicity and ER Stress Regulate Energy Balance. Cell Rep 9:366–377. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.08.057

Cormenier J, Martin N, Deslé J, Salazar-Cardozo C, Pourtier A, Abbadie C, Pluquet O (2018) The ATF6α arm of the Unfolded Protein Response mediates replicative senescence in human fibroblasts through a COX2/prostaglandin E2 intracrine pathway. Mech Ageing Dev 170:82–91. https://doi.org/10.1016/J.MAD.2017.08.003

Correia-Melo C, Marques FD, Anderson R, et al (2016) Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. EMBO J 35:724–742. https://doi.org/10.15252/EMBJ.201592862

Cragnolini AB, Friedman WJ (2008) The function of p75NTR in glia. Trends Neurosci 31:99–104. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2007.11.005

Crowe EP, Tuzer F, Gregory BD, Donahue G, Gosai SJ, Cohen J, Leung YY, Yetkin E, Nativio R, Wang LS, Sell C, Bonini NM, Berger SL, Brad Johnson F, Torres C (2016) Changes in the transcriptome of human astrocytes accompanying oxidative stress-induced senescence. Front Aging Neurosci 8:208. https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00208

De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, Truffa S, Biglioli P, Napolitano M, Capogrossi MC, Pesce M (2004) SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. Blood 104:3472–3482. https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-12-4423

de la Monte SM, Re E, Longato L, Tong M (2012) Dysfunctional Pro-Ceramide, ER Stress, and Insulin/IGF Signaling Networks with Progression of Alzheimer's Disease. J Alzheimer's Dis 30:S217–S229. https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111728

Desole C, Gallo S, Vitacolonna A, Montarolo F, Bertolotto A, Vivien D, Comoglio P, Crepaldi T (2021) HGF and MET: From Brain Development to Neurological Disorders. Front Cell Dev Biol 9:1321. https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.683609

Diaz-Amarilla P, Arredondo F, Boix V, Dapueto R, Carvalho D, Santi MD, Vasilskis E, Mesquita-Ribeiro R, Dajas-Bailador F, Abin-Carriquiry JA, Engler H, Savio E (2022) Isolation and characterization of neurotoxic astrocytes derived from old triple transgenic Alzheimer's disease mice. Neurochem Int 159:105403. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105403

Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragnolini A, Martínez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L (2011) Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A 108:18126–18131. https://doi.org/10.1073/pnas.1110689108

Diaz-Castro B, Gangwani MR, Yu X, Coppola G, Khakh BS (2019) Astrocyte molecular signatures in Huntington's disease. Sci Transl Med 11:eaaw8546. https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAW8546

Ding H, Chen J, Su M, Lin Z, Zhan H, Yang F, Li W, Xie J, Huang Y, Liu X, Liu B, Zhou X (2020) BDNF promotes activation of astrocytes and microglia contributing to neuroinflammation and mechanical allodynia in cyclophosphamide-induced cystitis. J Neuroinflammation 17:1–13. https://doi.org/10.1186/S12974-020-1704-0

Domeniconi M, Hempstead BL, Chao M V. (2007) Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death. Mol Cell Neurosci 34:271–279. https://doi.org/10.1016/J.MCN.2006.11.005

Dossi E, Vasile F, Rouach N (2018) Human astrocytes in the diseased brain. Brain Res Bull 136:139–156. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2017.02.001

Dougherty KD, Dreyfus CF, Black IB (2000) Brain-Derived Neurotrophic Factor in Astrocytes, Oligodendrocytes, and Microglia/Macrophages after Spinal Cord Injury. Neurobiol Dis 7:574–585. https://doi.org/10.1006/NBDI.2000.0318

Dukay B, Walter FR, Vigh JP, et al (2021) Neuroinflammatory processes are augmented in mice overexpressing human heat-shock protein B1 following ethanol-induced brain injury. J Neuroinflammation 18:1–24. https://doi.org/10.1186/S12974-020-02070-2

Duran-Aniotz C, Cornejo VH, Espinoza S, Ardiles ÁO, Medinas DB, Salazar C, Foley A, Gajardo I, Thielen P, Iwawaki T, Scheper W, Soto C, Palacios AG, Hoozemans JJM, Hetz C (2017) IRE1 signaling exacerbates Alzheimer's disease pathogenesis. Acta Neuropathol 134:489–506. https://doi.org/10.1007/S00401-017-1694-X

Escartin C, Galea E, Lakatos A, et al (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. Nat. Neurosci. 24:312–325. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4

Fahnestock M, Shekari A (2019) ProNGF and neurodegeneration in Alzheimer's disease. Front Neurosci 13:129. https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.00129

Fiebig C, Keiner S, Ebert B, Schäffner I, Jagasia R, Lie DC, Beckervordersandforth R (2019) Mitochondrial dysfunction in astrocytes impairs the generation of reactive astrocytes and enhances neuronal cell death in the cortex upon photothrombotic lesion. Front Mol Neurosci 12:40. https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00040

Forte M, Bianchi F, Cotugno M, et al (2020) Pharmacological restoration of autophagy reduces hypertension-related stroke occurrence. Autophagy 16:1468–1481. https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1687215

Franklin DA, He Y, Leslie PL, Tikunov AP, Fenger N, MacDonald JM, Zhang Y (2016) p53 coordinates DNA repair with nucleotide synthesis by suppressing PFKFB3 expression and promoting the pentose phosphate pathway. Sci Reports 6:38067. https://doi.org/10.1038/srep38067

Fu AKY, Hung KW, Yuen MYF, Zhou X, Mak DSY, Chan ICW, Cheung TH, Zhang B, Fu WY, Liew FY, Ip NY (2016) IL-33 ameliorates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. Proc Natl Acad Sci U S A 113:E2705–E2713. https://doi.org/10.1073/PNAS.1604032113

Fu F, Yang X, Zheng M, Zhao Q, Zhang K, Li Z, Zhang H, Zhang S (2020) Role of Transmembrane 4 L Six Family 1 in the Development and Progression of Cancer. Front. Mol. Biosci. 7:202. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00202

Fulmer CG, VonDran MW, Stillman AA, Huang Y, Hempstead BL, Dreyfus CF (2014) Astrocyte-Derived BDNF Supports Myelin Protein Synthesis after Cuprizone-Induced Demyelination. J Neurosci 34:8186–8196. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4267-13.2014

Furukawa T, Matsui N, Fujita K, Nodera H, Shimizu F, Miyamoto K, Takahashi Y, Kanda T, Kusunoki S, Izumi Y, Kaji R (2015) CSF cytokine profile distinguishes multifocal motor neuropathy from progressive muscular atrophy. Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation 2:e138. https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000138

Gadani SPP, Walsh JTT, Smirnov I, Zheng J, Kipnis J (2015) The Glia-Derived Alarmin IL-33 Orchestrates the Immune Response and Promotes Recovery following CNS Injury. Neuron 85:703–709. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.013

Gao J, Tan M, Gu M, Marshall C, Ding J, Hu G, Xiao M (2012) Cellular Localization of Aquaporin-1 in the Human and Mouse Trigeminal Systems. PLoS One 7:e46379. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0046379

Garone C, Minczuk M, Signes A, Fernandez-Vizarra E (2018) Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I–V and supercomplexes. Essays Biochem 62:255–270. https://doi.org/10.1042/EBC20170098

Genova ML, Lenaz G (2014) Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. Biochim Biophys Acta - Bioenerg 1837:427–443. https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2013.11.002

Gheibihayat SM, Cabezas R, Nikiforov NG, Jamialahmadi T, Johnston TP, Sahebkar A (2021) CD47 in the Brain and Neurodegeneration: An Update on the Role in Neuroinflammatory Pathways. Molecules 26:3943. https://doi.org/10.3390/MOLECULES26133943

Ghemrawi R, Battaglia-Hsu S-F, Arnold C (2018) Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders. Cells 7:63. https://doi.org/10.3390/CELLS7060063

Gibson GE, Chen HL, Xu H, Qiu L, Xu Z, Denton TT, Shi Q (2012) Deficits in the mitochondrial enzyme α-ketoglutarate dehydrogenase lead to Alzheimer's disease-like calcium dysregulation. Neurobiol Aging 33:1121.e13-1121.e24. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2011.11.003

Gilder AS, Natali L, Van Dyk DM, Zalfa C, Banki MA, Pizzo DP, Wang H, Klemke RL, Mantuano E, Gonias SL (2018) The Urokinase Receptor Induces a Mesenchymal Gene Expression Signature in Glioblastoma Cells and Promotes Tumor Cell Survival in Neurospheres. Sci Reports 8:2982. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21358-1

Giuliani D, Ottani A, Zaffe D, Galantucci M, Strinati F, Lodi R, Guarini S (2013) Hydrogen sulfide slows down progression of experimental Alzheimer's disease by targeting multiple pathophysiological mechanisms. Neurobiol Learn Mem 104:82–91. https://doi.org/10.1016/J.NLM.2013.05.006

Giuliani D, Galantucci M, Neri L, Canalini F, Calevro A, Bitto A, Ottani A, Vandini E, Sena P, Sandrini M, Squadrito F, Zaffe D, Guarini S (2014) Melanocortins protect against brain damage and counteract cognitive decline in a transgenic mouse model of moderate Alzheimer's disease. Eur J Pharmacol 740:144–150. https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2014.06.063

Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH (2010) Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. Cell 140:918–934. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.02.016

Goetzman ES, Prochownik E V. (2018) The role for myc in coordinating glycolysis, oxidative phosphorylation, glutaminolysis, and fatty acid metabolism in normal and neoplastic tissues. Front Endocrinol (Lausanne) 9:129. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00129

Gonzalez-Franquesa A, Stocks B, Chubanava S, Hattel HB, Moreno-Justicia R, Peijs L, Treebak JT, Zierath JR, Deshmukh AS (2021) Mass-spectrometry-based proteomics reveals mitochondrial supercomplexome plasticity. Cell Rep 35:109180. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2021.109180

González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D (2021) A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. FEBS J 288:56–80. https://doi.org/10.1111/FEBS.15570

Goss JR, O'Malley ME, Zou L, Styren SD, Kochanek PM, Dekosky ST (1998) Astrocytes Are the Major Source of Nerve Growth Factor Upregulation Following Traumatic Brain Injury in the Rat. Exp Neurol 149:301–309. https://doi.org/10.1006/EXNR.1997.6712

Granic I, Dolga AM, Nijholt IM, van Dijk G, Eisel ULM (2009) Inflammation and NF-κB in Alzheimer's Disease and Diabetes. J Alzheimer's Dis 16:809–821. https://doi.org/10.3233/JAD-2009-0976

Grimaldi A, Pediconi N, Oieni F, Pizzarelli R, Rosito M, Giubettini M, Santini T, Limatola C, Ruocco G, Ragozzino D, Di Angelantonio S (2019) Neuroinflammatory Processes, A1 Astrocyte Activation and Protein Aggregation in the Retina of Alzheimer's Disease Patients, Possible Biomarkers for Early Diagnosis. Front Neurosci 13:925. https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.00925

Grubman A, Choo XY, Chew G, et al (2021) Transcriptional signature in microglia associated with Aβ plaque phagocytosis. Nat Commun 12:3015. https://doi.org/10.1038/s41467-021-23111-1

Gu LZ, Huang BS, Shen W, Gao L, Ding ZZ, Wu HW, Guo J (2013) Early activation of nSMase2/ceramide pathway in astrocytes is involved in ischemia-associated neuronal damage via inflammation in rat hippocampi. J Neuroinflammation 10:1–16. https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-109

Guttenplan KA, Weigel MK, Prakash P, Wijewardhane PR, Hasel P, Rufen-Blanchette U, Münch AE, Blum JA, Fine J, Neal MC, Bruce KD, Gitler AD, Chopra G, Liddelow SA, Barres BA (2021) Neurotoxic reactive astrocytes induce cell death via saturated lipids. Nature 599:102–107. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03960-y

Guyon A (2014) CXCL12 chemokine and its receptors as major players in the interactions between immune and nervous systems. Front Cell Neurosci 8:65. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00065

Gveric D, Hanemaaijer R, Newcombe J, Van Lent NA, Sier CFM, Cuzner ML (2001) Plasminogen activators in multiple sclerosis lesionsImplications for the inflammatory response and axonal damage. Brain 124:1978–1988. https://doi.org/10.1093/BRAIN/124.10.1978

Habib N, McCabe C, Medina S, Varshavsky M, Kitsberg D, Dvir-Szternfeld R, Green G, Dionne D, Nguyen L, Marshall JL, Chen F, Zhang F, Kaplan T, Regev A, Schwartz M (2020) Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. Nature 23:701–706. https://doi.org/10.1038/s41593-020-0624-8

Hart LS, Cunningham JT, Datta T, et al (2012) ER stress–mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. J Clin Invest 122:4621–4634. https://doi.org/10.1172/JCI62973

Hedhli N, Falcone DJ, Huang B, Cesarman-Maus G, Kraemer R, Zhai H, Tsirka SE, Santambrogio L, Hajjar KA (2012) The annexin A2/S100A10 system in health and disease: Emerging paradigms. J Biomed Biotechnol 2012:406273. https://doi.org/10.1155/2012/406273

Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, et al (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. Lancet Neurol 14:388. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5

Heneka MT, Kummer MP, Latz E (2014) Innate immune activation in neurodegenerative disease. Nat Rev Immunol 14:463–477. https://doi.org/10.1038/nri3705

Henrik Heiland D, Ravi VM, Behringer SP, et al (2019) Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. Nat Commun 10:2541. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10493-6

Hertz L, Peng L, Dienel GA (2007) Energy metabolism in astrocytes: High rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. J Cereb Blood Flow Metab 27:219–249. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600343

Ho L, Purohit D, Haroutunian V, Luterman JD, Willis F, Naslund J, Buxbaum JD, Mohs RC, Aisen PS, Pasinetti GM (2001) Neuronal Cyclooxygenase 2 Expression in the Hippocampal Formation as a Function of the Clinical Progression of Alzheimer Disease. Arch Neurol 58:487–492. https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.58.3.487

Holmberg Olausson K, Elsir T, Moazemi Goudarzi K, Nistér M, Lindström MS (2015) NPM1 histone chaperone is upregulated in glioblastoma to promote cell survival and maintain nucleolar shape. Sci Reports 5:16495. https://doi.org/10.1038/srep16495

Horna-Terrón E, Pradilla-Dieste A, Sánchez-de-Diego C, Osada J (2014) TXNDC5, a Newly Discovered Disulfide Isomerase with a Key Role in Cell Physiology and Pathology. Int J Mol Sci 15:23501–23518. https://doi.org/10.3390/IJMS151223501

Hotamisligil GS (2010) Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. Cell 140:900–917. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.02.034

Hou S, Zhao M-M, Shen P-P, Liu X-P, Sun Y, Feng J-C (2016) Neuroprotective Effect of Salvianolic Acids against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. Int J Mol Sci 17:1190. https://doi.org/10.3390/ijms17071190

Hove I Van, Lemmens K, Velde S Van de, Verslegers M, Moons L (2012) Matrix metalloproteinase-3 in the central nervous system: a look on the bright side. J Neurochem 123:203–216. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2012.07900.X

Hoyaux D, Boom A, Van Den Bosch L, Belot N, Martin JJ, Heizmann CW, Kiss R, Pochet R (2002) S100A6 Overexpression within Astrocytes Associated with Impaired Axons from Both ALS Mouse Model and Human Patients. J Neuropathol Exp Neurol 61:736–744. https://doi.org/10.1093/JNEN/61.8.736

Hu WH, Walters WM, Xia XM, Karmally SA, Bethea JR (2003) Neuronal glutamate transporter EAAT4 is expressed in astrocytes. Glia 44:13–25. https://doi.org/10.1002/GLIA.10268

Hur JY, Frost GR, Wu X, et al (2020) The innate immunity protein IFITM3 modulates γ-secretase in Alzheimer's disease. Nature 586:735–740. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2681-2

Itoh N, Itoh Y, Tassoni A, Ren E, Kaito M, Ohno A, Ao Y, Farkhondeh V, Johnsonbaugh H, Burda J, Sofroniew M V., Voskuhl RR (2017) Cell-specific and region-specific transcriptomics in the multiple sclerosis model: Focus on astrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 115:E302–E309. https://doi.org/10.1073/PNAS.1716032115

Jang S, Javadov S (2018) Elucidating the contribution of ETC complexes I and II to the respirasome formation in cardiac mitochondria. Sci Reports 8:17732. https://doi.org/10.1038/s41598-018-36040-9

Javonillo DI, Tran KM, Phan J, et al (2022) Systematic Phenotyping and Characterization of the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease. Front Neurosci 15:1829. https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.785276

Jeon MT, Moon GJ, Kim S, Choi M, Oh YS, Kim DW, Kim HJ, Lee KJ, Choe Y, Ha CM, Jang IS, Nakamura M, McLean C, Chung WS, Shin WH, Lee SG, Kim SR (2020) Neurotrophic interactions between neurons and astrocytes following AAV1-Rheb(S16H) transduction in the hippocampus in vivo. Br J Pharmacol 177:668–686. https://doi.org/10.1111/BPH.14882

Jha NK, Jha SK, Kar R, Nand P, Swati K, Goswami VK (2019) Nuclear factor-kappa β as a therapeutic target for Alzheimer's disease. J Neurochem 150:113–137. https://doi.org/10.1111/JNC.14687

Joshi AU, Minhas PS, Liddelow SA, Haileselassie B, Andreasson KI, Dorn GW, Mochly-Rosen D (2019) Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. Nat Neurosci 22:1635–1648. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0486-0

Jurga AM, Paleczna M, Kadluczka J, Kuter KZ (2021) Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. Biomol 11:1361. https://doi.org/10.3390/BIOM11091361

Jurk D, Wang C, Miwa S, Maddick M, Korolchuk V, Tsolou A, Gonos ES, Thrasivoulou C, Jill Saffrey M, Cameron K, von Zglinicki T (2012) Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. Aging Cell 11:996–1004. https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2012.00870.X

Kamil M, Shinsato Y, Higa N, Hirano T, Idogawa M, Takajo T, Minami K, Shimokawa M, Yamamoto M, Kawahara K, Yonezawa H, Hirano H, Furukawa T, Yoshimoto K, Arita K (2019) High filamin-C expression predicts enhanced invasiveness and poor outcome in glioblastoma multiforme. Br J Cancer 120:819–826. https://doi.org/10.1038/s41416-019-0413-x

Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Ishiguro-Watanabe M, Tanabe M (2021) KEGG: integrating viruses and cellular organisms. Nucleic Acids Res. 49:D545-D551. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa970

Khakh BS, Sofroniew M V (2015) Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits Introduction and historical perspective. Nat Neurosci 18:942–952. https://doi.org/10.1038/nn.4043.Diversity

Kim EM, Hwang O (2011) Role of matrix metalloproteinase-3 in neurodegeneration. J Neurochem 116:22–32. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2010.07082.X

Kim NH, Cha YH, Lee J, et al (2017) Snail reprograms glucose metabolism by repressing phosphofructokinase PFKP allowing cancer cell survival under metabolic stress. Nat Commun 8:14374. https://doi.org/10.1038/ncomms14374

Kondo S, Murakami T, Tatsumi K, Ogata M, Kanemoto S, Otori K, Iseki K, Wanaka A, Imaizumi K (2005) OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. Nat Cell Biol 7:186–194. https://doi.org/10.1038/ncb1213

Kritsilis M, Rizou S V., Koutsoudaki PN, Evangelou K, Gorgoulis VG, Papadopoulos D (2018) Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. Int J Mol Sci 19:2937. https://doi.org/10.3390/IJMS19102937

Kummer KK, Zeidler M, Kalpachidou T, Kress M (2021) Role of IL-6 in the regulation of neuronal development, survival and function. Cytokine 144:155582. https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2021.155582

Laske C, Stellos K, Eschweiler GW, Leyhe T, Gawaz M (2008) Decreased CXCL12 (SDF-1) Plasma Levels in Early Alzheimer's Disease: A Contribution to a Deficient Hematopoietic Brain Support? J Alzheimer's Dis 15:83–95. https://doi.org/10.3233/JAD-2008-15107

Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK (2014) Voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. Genome Biol 15:R29. https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29

Le A, Lane AN, Hamaker M, Bose S, Gouw A, Barbi J, Tsukamoto T, Rojas CJ, Slusher BS, Zhang H, Zimmerman LJ, Liebler DC, Slebos RJC, Lorkiewicz PK, Higashi RM, Fan TWM, Dang C V. (2012) Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in b cells. Cell Metab 15:110–121. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2011.12.009

Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES (2006) Senescence-associated β-galactosidase is lysosomal β-galactosidase. Aging Cell 5:187–195. https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2006.00199.X

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins. Science 294:1945-8. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1065057

Lee TH, Kato H, Chen ST, Kogure K, Itoyama Y (1998) Expression of Nerve Growth Factor and trkA After Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. Stroke 29:1687–1697. https://doi.org/10.1161/01.STR.29.8.1687

Lei WL, Xing SG, Deng CY, Ju XC, Jiang XY, Luo ZG (2012) Laminin/β1 integrin signal triggers axon formation by promoting microtubule assembly and stabilization. Cell Res 22:954–972. https://doi.org/10.1038/cr.2012.40

Leslie CC (2015) Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. J Lipid Res 56:1386–1402. https://doi.org/10.1194/JLR.R057588

Letellier T, Heinrich R, Malgat M, Mazat JP (1994) The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach. Biochem J 302:171–174. https://doi.org/10.1042/BJ3020171

Leung R, Proitsi P, Simmons A, Lunnon K, Güntert A, Kronenberg D, Pritchard M, Tsolaki M, Mecocci P, Kloszewska I, Vellas B, Soininen H, Wahlund LO, Lovestone S (2013) Inflammatory Proteins in Plasma Are Associated with Severity of Alzheimer's Disease. PLoS One 8:e64971. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0064971

Li J, Yu L, Gu X, Ma Y, Pasqualini R, Arap W, Snyder EY, Sidman RL (2013) Tissue plasminogen activator regulates Purkinje neuron development and survival. Proc Natl Acad Sci U S A 110:E2410–E2419. https://doi.org/10.1073/PNAS.1305010110

Li T, Chen X, Zhang C, Zhang Y, Yao W (2019) An update on reactive astrocytes in chronic pain. J Neuroinflammation 16:140. https://doi.org/10.1186/S12974-019-1524-2

Liao Y, Smyth GK, Shi W (2019) The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. Nucleic Acids Res 47:e47. https://doi.org/10.1093/nar/gkz114

Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics 30:923–930. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656

Liddelow SA, Barres BA (2017) Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. Immunity 46:957–967. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006

Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature 541:481–487. https://doi.org/10.1038/nature21029

Liew FY, Girard JP, Turnquist HR (2016) Interleukin-33 in health and disease. Nat Rev Immunol 16:676–689. https://doi.org/10.1038/nri.2016.95

Linnerbauer M, Rothhammer V (2020) Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. Front Immunol 11:2571. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.573256

Lobo-Jarne T, Pérez-Pérez R, Fontanesi F, Timón-Gómez A, Wittig I, Peñas A, Serrano-Lorenzo P, García-Consuegra I, Arenas J, Martín MA, Barrientos A, Ugalde C (2020) Multiple pathways coordinate assembly of human mitochondrial complex IV and stabilization of respiratory supercomplexes. EMBO J 39:e103912. https://doi.org/10.15252/EMBJ.2019103912

Löffek S, Schilling O, Franzke CW (2011) Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. Eur Respir J 38:191–208. https://doi.org/10.1183/09031936.00146510

Lopez-Fabuel I, Le Douce J, Logan A, James AM, Bonvento G, Murphy MP, Almeida A, Bolaños JP (2016) Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 113:13063–13068. https://doi.org/10.1073/PNAS.1613701113

Lõpez-Hernández B, Ceña V, Posadas I (2015) The endoplasmic reticulum stress and the HIF-1 signalling pathways are involved in the neuronal damage caused by chemical hypoxia. Br J Pharmacol 172:2838–2851. https://doi.org/10.1111/BPH.13095

Love MI, Anders S, Kim V, Huber W (2015) RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. F1000Research 4:1070. https://doi.org/10.12688/f1000research.7035.1

Luo W, Friedman MS, Shedden K, Hankenson KD, Woolf PJ (2009) GAGE: Generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. BMC Bioinformatics 10:161. https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-161

Ma D, Doi Y, Jin S, Li E, Sonobe Y, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A (2012) TGF-β induced by interleukin-34-stimulated microglia regulates microglial proliferation and attenuates oligomeric amyloid β neurotoxicity. Neurosci Lett 529:86–91. https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2012.08.071

Madathil SK, Carlson SW, Brelsfoard JM, Ye P, D'Ercole AJ, Saatman KE (2013) Astrocyte-Specific Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-1 Protects Hippocampal Neurons and Reduces Behavioral Deficits following Traumatic Brain Injury in Mice. PLoS One 8:e67204. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0067204

Malinin NL, Wright S, Seuber P, Schenk D, Griswold-Prenner I (2005) Amyloid-β neurotoxicity is mediated by FISH adapter protein and ADAM12 metalloprotease activity. Proc Natl Acad Sci 102:3058–3063. https://doi.org/10.1073/PNAS.0408237102

Manjang K, Tripathi S, Yli-Harja O, Dehmer M, Emmert-Streib F (2020) Graph-based exploitation of gene ontology using GOxploreR for scrutinizing biological significance. Sci Rep 10:16672. https://doi.org/10.1038/s41598-020-73326-3

Marchetti L, Bonsignore F, Gobbo F, Amodeo R, Calvello M, Jacob A, Signore G, Spagnolo CS, Porciani D, Mainardi M, Beltram F, Luin S, Cattaneo A (2019) Fast-diffusing p75NTR monomers support apoptosis and growth cone

collapse by neurotrophin ligands. Proc Natl Acad Sci U S A 116:21563–21572. https://doi.org/10.1073/PNAS.1902790116

Martin-Jiménez CA, García-Vega Á, Cabezas R, Aliev G, Echeverria V, González J, Barreto GE (2017) Astrocytes and endoplasmic reticulum stress: A bridge between obesity and neurodegenerative diseases. Prog Neurobiol 158:45–68. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2017.08.001

McKenzie AT, Wang M, Hauberg ME, Fullard JF, Kozlenkov A, Keenan A, Hurd YL, Dracheva S, Casaccia P, Roussos P, Zhang B (2018) Brain Cell Type Specific Gene Expression and Co-expression Network Architectures. Sci Reports 8:1–19. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27293-5

Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K (2012) c-Myc and Cancer Metabolism. Clin Cancer Res 18:5546–5553. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977

Mizuno T, Doi Y, Mizoguchi H, Jin S, Noda M, Sonobe Y, Takeuchi H, Suzumura A (2011) Interleukin-34 Selectively Enhances the Neuroprotective Effects of Microglia to Attenuate Oligomeric Amyloid-β Neurotoxicity. Am J Pathol 179:2016–2027. https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2011.06.011

Molofsky A V., Krenick R, Ullian E, Tsai H, Deneen B, Richardson WD, Barres BA, Rowitch DH (2012) Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. Genes Dev 26:891–907. https://doi.org/10.1101/GAD.188326.112

Monterey MD, Wei H, Wu X, Wu JQ (2021) The Many Faces of Astrocytes in Alzheimer's Disease. Front Neurol 12:1402. https://doi.org/10.3389/FNEUR.2021.619626

Morte B, Bernal J (2014) Thyroid hormone action: Astrocyte-neuron communication. Front Endocrinol (Lausanne) 5:82. https://doi.org/10.3389/FENDO.2014.00082

Mouthon MA, Morizur L, Dutour L, Pineau D, Kortulewski T, Boussin FD (2020) Syndecan-1 Stimulates Adult Neurogenesis in the Mouse Ventricular-Subventricular Zone after Injury. iScience 23:101784. https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2020.101784

Mysona BA, Matragoon S, Stephens M, Mohamed IN, Farooq A, Bartasis ML, Fouda AY, Shanab AY, Espinosa-Heidmann DG, El-Remessy AB (2015) Imbalance of the nerve growth factor and its precursor as a potential biomarker for diabetic retinopathy. Biomed Res Int 2015:571456. https://doi.org/10.1155/2015/571456

Nafar F, Williams JB, Mearow KM (2016) Astrocytes Release HspB1 in Response to Amyloid-β Exposure in vitro. J Alzheimer's Dis 49:251–263. https://doi.org/10.3233/JAD-150317

Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang HY (2003) Astrocytes accumulate Aβ42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. Brain Res 971:197–209. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02361-8

Nakagawa T, Schwartz JP (2004) Gene Expression Profiles of Reactive Astrocytes in Dopamine-depleted Striatum. Brain Pathol 14:275–280. https://doi.org/10.1111/J.1750-3639.2004.TB00064.X

Neo SH, Tang BL (2017) Collagen 1 signaling at the central nervous system injury site and astrogliosis. Neural Regen Res 12:1600. https://doi.org/10.4103/1673-5374.217323

Niu H, Gou R, Xu Q, Duan D (2017) Recombinant insulin-like growth factor binding protein-4 inhibits proliferation and promotes differentiation of neural progenitor cells. Neurosci Lett 642:71–76. https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2017.01.066

Nwaobi SE, Cuddapah VA, Patterson KC, Randolph AC, Olsen ML (2016) The role of glial-specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS. Acta Neuropathol 132:1–21. https://doi.org/10.1007/S00401-016-1553-1

Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003a) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 24:1063–1070. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2003.08.012

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003b) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. Neuron 39:409–21. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3

Olsen ML, Khakh BS, Skatchkov SN, Zhou M, Lee CJ, Rouach N (2015) New Insights on Astrocyte Ion Channels: Critical for Homeostasis and Neuron-Glia Signaling. J Neurosci 35:13827–13835. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2603-15.2015

Ottestad-Hansen S, Hu QX, Follin-Arbelet VV, Bentea E, Sato H, Massie A, Zhou Y, Danbolt NC (2018) The cystine-glutamate exchanger (xCT, Slc7a11) is expressed in significant concentrations in a subpopulation of astrocytes in the mouse brain. Glia 66:951–970. https://doi.org/10.1002/GLIA.23294

Pajarillo E, Rizor A, Lee J, Aschner M, Lee E (2019) The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. Neuropharmacology 161:107559. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2019.03.002

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC (2006) HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. Cell Metab 3:187–197. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2006.01.012

Parachikova A, Cotman CW (2007) Reduced CXCL12/CXCR4 results in impaired learning and is downregulated in a mouse model of Alzheimer disease. Neurobiol Dis 28:143–153. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2007.07.001

Parajuli B, Horiuchi H, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A (2015) CCL11 enhances excitotoxic neuronal death by producing reactive oxygen species in microglia. Glia 63:2274–2284. https://doi.org/10.1002/GLIA.22892

Patro S, Ratna S, Yamamoto HA, Ebenezer AT, Ferguson DS, Kaur A, McIntyre BC, Snow R, Solesio ME (2021) ATP Synthase and Mitochondrial Bioenergetics Dysfunction in Alzheimer's Disease. Int J Mol Sci 22:11185. https://doi.org/10.3390/IJMS222011185

Paumier JM, Py NA, García-González L, Bernard A, Stephan D, Louis L, Checler F, Khrestchatisky M, Baranger K, Rivera S (2019) Proamyloidogenic effects of membrane type 1 matrix metalloproteinase involve MMP-2 and BACE-1 activities, and the modulation of APP trafficking. FASEB J 33:2910–2927. https://doi.org/10.1096/FJ.201801076R

Pitt J, Wilcox KC, Tortelli V, Diniz LP, Oliveira MS, Dobbins C, Yu XW, Nandamuri S, Gomes FCA, DiNunno N, Viola KL, De Felice FG, Ferreira ST, Klein WL (2017) Neuroprotective astrocyte-derived insulin/insulin-like growth factor 1 stimulates endocytic processing and extracellular release of neuron-bound Aβ oligomers. Mol Biol Cell 28:2623–2636. https://doi.org/10.1091/MBC.E17-06-0416

Potokar M, Morita M, Wiche G, Jorgačevski J (2020) The Diversity of Intermediate Filaments in Astrocytes. Cells 9:1604. https://doi.org/10.3390/CELLS9071604

Pöyhönen S, Er S, Domanskyi A, Airavaara M (2019) Effects of neurotrophic factors in glial cells in the central nervous system: Expression and properties in neurodegeneration and injury. Front Physiol 10:486. https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.00486

Prasad VVTS, Nithipatikom K, Harder DR (2008) Ceramide elevates 12-hydroxyeicosatetraenoic acid levels and upregulates 12-lipoxygenase in rat primary hippocampal cell cultures containing predominantly astrocytes. Neurochem Int 53:220–229. https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2008.07.002

Proitsi P, Lupton MK, Dudbridge F, et al (2012) Alzheimer's disease and age-related macular degeneration have different genetic models for complement gene variation. Neurobiol Aging 33:1843.e9-1843.e17. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2011.12.036

Qu W-S, Wang Y-H, Ma J-F, Tian D-S, Zhang Q, Pan D-J, Yu Z-Y, Xie M-J, Wang J-P, Wang W (2011) Galectin-1 attenuates astrogliosis-associated injuries and improves recovery of rats following focal cerebral ischemia. J Neurochem 116:217–226. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2010.07095.X

Qu WS, Wang YH, Wang JP, Tang YX, Zhang Q, Tian DS, Yu ZY, Xie MJ, Wang W (2010) Galectin-1 Enhances Astrocytic BDNF Production and Improves Functional Outcome in Rats Following Ischemia. Neurochem Res 35:1716–1724. https://doi.org/10.1007/S11064-010-0234-Z

Raffa S, Chin XLD, Stanzione R, Forte M, Bianchi F, Cotugno M, Marchitti S, Micaloni A, Gallo G, Schirone L, Tocci G, Violini R, Torrisi MR, Volpe M, Rubattu S (2019) The reduction of NDUFC2 expression is associated with mitochondrial impairment in circulating mononuclear cells of patients with acute coronary syndrome. Int J Cardiol 286:127–133. https://doi.org/10.1016/J.IJCARD.2019.02.027

Raman D, Milatovic SZ, Milatovic D, Splittgerber R, Fan GH, Richmond A (2011) Chemokines, macrophage inflammatory protein-2 and stromal cell-derived factor-1α, suppress amyloid β-induced neurotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol 256:300–313. https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2011.06.006

Reitzer LJ, Wice BM, Kennel1 D (1979) Evidence That Glutamine, Not Sugar, Is the Major Energy Source for Cultured HeLa Cells*. J Biol Chem 254:2669–2676. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30124-2

Rempe RG, Hartz AM, Bauer B (2016) Matrix metalloproteinases in the brain and blood–brain barrier: Versatile breakers and makers. J Cereb Blood Flow Metab 36:1481–1507. https://doi.org/10.1177/0271678X16655551

Rivera S, García-González L, Khrestchatisky M, Baranger K (2019) Metalloproteinases and their tissue inhibitors in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Cell Mol Life Sci 76:3167–3191. https://doi.org/10.1007/S00018-019-03178-2

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139–140. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616

Rubattu S, Di Castro S, Schulz H, et al (2016) Ndufc2 Gene Inhibition Is Associated With Mitochondrial Dysfunction and Increased Stroke Susceptibility in an Animal Model of Complex Human Disease. J Am Heart Assoc 5:e002701. https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002701

Saha P, Sarkar S, Paidi RK, Biswas SC (2020) TIMP-1: A key cytokine released from activated astrocytes protects neurons and ameliorates cognitive behaviours in a rodent model of Alzheimer's disease. Brain Behav Immun 87:804–819. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2020.03.014

Salvadó L, Palomer X, Barroso E, Vázquez-Carrera M (2015) Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. Trends Endocrinol Metab 26:438–448. https://doi.org/10.1016/J.TEM.2015.05.007

Sánchez-Valle J, Tejero H, Ibáñez K, Portero JL, Krallinger M, Al-Shahrour F, Tabarés-Seisdedos R, Baudot A, Valencia A (2017) A molecular hypothesis to explain direct and inverse co-morbidities between Alzheimer's Disease, Glioblastoma and Lung cancer. Sci Reports 7:4474. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04400-6

Savchenko E, Teku GN, Boza-Serrano A, Russ K, Berns M, Deierborg T, Lamas NJ, Wichterle H, Rothstein J, Henderson CE, Vihinen M, Roybon L (2019) FGF family members differentially regulate maturation and proliferation of stem cell-derived astrocytes. Sci Reports 9:9610. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46110-1

Schägger H (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. Biochim Biophys Acta - Bioenerg 1555:154–159. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00271-2

Schmitz ML, Shaban MS, Albert BV, Gökçen A, Kracht M (2018) The Crosstalk of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Pathways with NF-κB: Complex Mechanisms Relevant for Cancer, Inflammation and Infection. Biomed 6:58. https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES6020058

Sekar S, McDonald J, Cuyugan L, Aldrich J, Kurdoglu A, Adkins J, Serrano G, Beach TG, Craig DW, Valla J, Reiman EM, Liang WS (2015) Alzheimer's disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes. Neurobiol Aging 36:583–591. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2014.09.027

Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Mol Med 8:595–608. https://doi.org/10.15252/emmm.201606210

Sha Z, Zhou J, Wu Y, Zhang T, Li C, Meng Q, Musunuru PP, You F, Wu Y, Yu R, Gao S (2020) BYSL Promotes Glioblastoma Cell Migration, Invasion, and Mesenchymal Transition Through the GSK-3β/β-Catenin Signaling Pathway. Front Oncol 10:2003. https://doi.org/10.3389/FONC.2020.565225

Shin JW, Lee JK, Lee JE, Min WK, Schuchman EH, Jin HK, Bae JS (2011) Combined Effects of Hematopoietic Progenitor Cell Mobilization from Bone Marrow by Granulocyte Colony Stimulating Factor and AMD3100 and Chemotaxis into the Brain Using Stromal Cell-Derived Factor-1α in an Alzheimer's Disease Mouse Model. Stem Cells 29:1075–1089. https://doi.org/10.1002/STEM.659

Simmnacher K, Krach F, Schneider Y, Alecu JE, Mautner L, Klein P, Roybon L, Prots I, Xiang W, Winner B (2020) Unique signatures of stress-induced senescent human astrocytes. Exp Neurol 334:113466. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113466

Sirivichayakul S, Kanchanatawan B, Thika S, Carvalho AF, Maes M (2018) Eotaxin, an Endogenous Cognitive Deteriorating Chemokine (ECDC), Is a Major Contributor to Cognitive Decline in Normal People and to Executive, Memory, and Sustained Attention Deficits, Formal Thought Disorders, and Psychopathology in Schizophrenia Patients. Neurotox 35:122–138. https://doi.org/10.1007/S12640-018-9937-8

Smith HL, Freeman OJ, Butcher AJ, Holmqvist S, Humoud I, Schätzl T, Hughes DT, Verity NC, Swinden DP, Hayes J, de Weerd L, Rowitch DH, Franklin RJM, Mallucci GR (2020) Astrocyte Unfolded Protein Response Induces a Specific Reactivity State that Causes Non-Cell-Autonomous Neuronal Degeneration. Neuron 105:855-866.e5. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.12.014

Smyth GK, Ritchie ME, Law CW, Alhamdoosh M, Su S, Dong X, Tian L, Smyth GK, Ritchie ME (2018) RNA-seq analysis is easy as 1-2-3 with limma, Glimma and edgeR. F1000Research 5:1408. https://doi.org/10.12688/f1000research.9005.3

Sofroniew M V. (2020) Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. Trends Immunol 41:758–770. https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.07.004

Sofroniew M V., Vinters H V. (2010) Astrocytes: Biology and pathology. Acta Neuropathol 119:7–35. https://doi.org/10.1007/S00401-009-0619-8

Sorbi S, Bird ED, Blass JP (1983) Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. Ann Neurol 13:72–78. https://doi.org/10.1002/ANA.410130116

Soucek T, Cumming R, Dargusch R, Maher P, Schubert D (2003) The Regulation of Glucose Metabolism by HIF-1 Mediates a Neuroprotective Response to Amyloid Beta Peptide. Neuron 39:43–56. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00367-2

Spanos F, Liddelow SA (2020) An Overview of Astrocyte Responses in Genetically Induced Alzheimer's Disease Mouse Models. Cells 9:2415. https://doi.org/10.3390/CELLS9112415

Starossom SC, Mascanfroni ID, Imitola J, Cao L, Raddassi K, Hernandez SF, Bassil R, Croci DO, Cerliani JP, Delacour D, Wang Y, Elyaman W, Khoury SJ, Rabinovich GA (2012) Galectin-1 Deactivates Classically Activated Microglia and Protects from Inflammation-Induced Neurodegeneration. Immunity 37:249–263. https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2012.05.023

Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E, Olin-Sandoval V, Grüning NM, Krüger A, Tauqeer Alam M, Keller MA, Breitenbach M, Brindle KM, Rabinowitz JD, Ralser M (2015) The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. Biol Rev 90:927–963. https://doi.org/10.1111/BRV.12140

Sturm M, Schroeder C, Bauer P (2016) SeqPurge: Highly-sensitive adapter trimming for paired-end NGS data. BMC Bioinformatics 17:208. https://doi.org/10.1186/s12859-016-1069-7

Sun S, Sun Y, Ling S-C, Ferraiuolo L, McAlonis-Downes M, Zou Y, Drenner K, Wang Y, Ditsworth D, Tokunaga S, Kopelevich A, Kaspar BK, Lagier-Tourenne C, Cleveland DW (2015) Translational profiling identifies a cascade of damage initiated in motor neurons and spreading to glia in mutant SOD1-mediated ALS. Proc Natl Acad Sci 112:E6993–E7002. https://doi.org/10.1073/PNAS.1520639112

Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T (2011) REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. PLoS One 6:e21800. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800

Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Von Mering C (2019) STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage,

supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res 47:D607–D613. https://doi.org/10.1093/nar/gky1131

Tang JX, Thompson K, Taylor RW, Oláhová M (2020) Mitochondrial OXPHOS biogenesis: Co-regulation of protein synthesis, import, and assembly pathways. Int J Mol Sci 21:1–32. https://doi.org/10.3390/IJMS21113820

Tham A, Nordberg A, Grissom FE, Carlsson-Skwirut C, Viitanen M, Sara VR (1993) Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with dementia of the Alzheimer type. J Neural Transm - Park Dis Dement Sect 5:165–176. https://doi.org/10.1007/BF02257671

Thorén MM, Masoumi KC, Krona C, Huang X, Kundu S, Schmidt L, Forsberg-Nilsson K, Keep MF, Englund E, Nelander S, Holmqvist B, Lundgren-Åkerlund E (2019) Integrin α10, a Novel Therapeutic Target in Glioblastoma, Regulates Cell Migration, Proliferation, and Survival. Cancers 11:587. https://doi.org/10.3390/CANCERS11040587

Tian W, Sawyer A, Kocaoglu FB, Kyriakides TR (2011) Astrocyte-Derived Thrombospondin-2 Is Critical for the Repair of the Blood-Brain Barrier. Am J Pathol 179:860–868. https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2011.05.002

Tiveron C, Fasulo L, Capsoni S, et al (2013) ProNGF\NGF imbalance triggers learning and memory deficits, neurodegeneration and spontaneous epileptic-like discharges in transgenic mice. Cell Death Differ 20:1017–1030. https://doi.org/10.1038/cdd.2013.22

Tseng KY, Anttila JE, Khodosevich K, Tuominen RK, Lindahl M, Domanskyi A, Airavaara M (2018) MANF Promotes Differentiation and Migration of Neural Progenitor Cells with Potential Neural Regenerative Effects in Stroke. Mol Ther 26:238–255. https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2017.09.019

Tseng KY, Danilova T, Domanskyi A, Saarma M, Lindahl M, Airavaara M (2017) MANF Is Essential for Neurite Extension and Neuronal Migration in the Developing Cortex. eNeuro 4:214-217. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0214-17.2017

Vainchtein ID, Chin G, Cho FS, Kelley KW, Miller JG, Chien EC, Liddelow SA, Nguyen PT, Nakao-Inoue H, Dorman LC, Akil O, Joshita S, Barres BA, Paz JT, Molofsky AB, Molofsky A V. (2018) Astrocyte-derived interleukin-33 promotes microglial synapse engulfment and neural circuit development. Science 359:1269–1273. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAL3589

Varcianna A, Myszczynska MA, Castelli LM, O'Neill B, Kim Y, Talbot J, Nyberg S, Nyamali I, Heath PR, Stopford MJ, Hautbergue GM, Ferraiuolo L (2019) Micro-RNAs secreted through astrocyte-derived extracellular vesicles cause neuronal network degeneration in C9orf72 ALS. EBioMedicine 40:626–635. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.067

Verkhratsky A, Nedergaard M (2017) Physiology of Astroglia. Physiol Rev 98:239–389. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00042.2016

Viejo L, Noori A, Merrill E, Das S, Hyman BT, Serrano-Pozo A (2021) Systematic review of human post-mortem immunohistochemical studies and bioinformatics analyses unveil the complexity of astrocyte reaction in Alzheimer's disease. Neuropathol Appl Neurobiol 48:e12753. https://doi.org/10.1111/NAN.12753

Villarreal A, Rosciszewski G, Murta V, Cadena V, Usach V, Dodes-Traian MM, Setton-Avruj P, Barbeito LH, Ramos AJ (2016) Isolation and Characterization of Ischemia-Derived Astrocytes (IDAs) with Ability to Transactivate Quiescent Astrocytes. Front Cell Neurosci 10:139. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2016.00139

Villeda SA, Luo J, Mosher KI, et al (2011) The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. Nature 477:90–94. https://doi.org/10.1038/nature10357

Wang C, Zhang F, Jiang S, Siedlak SL, Shen L, Perry G, Wang X, Tang B, Zhu X (2016) Estrogen receptor-α is localized to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Sci Reports 6:20352. https://doi.org/10.1038/srep20352

Wang J, Sareddy GR, Lu Y, Pratap UP, Tang F, Greene KM, Meyre PL, Tekmal RR, Vadlamudi RK, Brann DW (2020a) Astrocyte-Derived Estrogen Regulates Reactive Astrogliosis and is Neuroprotective following Ischemic Brain Injury. J Neurosci 40:9751–9771. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0888-20.2020

Wang L, Dong H, Song G, Zhang R, Pan J, Han J (2017) TXNDC5 synergizes with HSC70 to exacerbate the inflammatory phenotype of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis through NF-κB signaling. Cell Mol Immunol 15:685–696. https://doi.org/10.1038/cmi.2017.20

Wang Q, Xu Y, Chen JC, Qin YY, Liu M, Liu Y, Xie MJ, Yu ZY, Zhu Z, Wang W (2012) Stromal cell-derived factor 1α decreases β-amyloid deposition in Alzheimer's disease mouse model. Brain Res 1459:15–26. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2012.04.011

Wang W, Zhao F, Ma X, Perry G, Zhu X (2020b) Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances. Mol Neurodegener 15:30. https://doi.org/10.1186/S13024-020-00376-6

Wang Y, Chen Y, Zhou Q, Xu J, Qian Q, Ni P, Qian Y (2018) Mild endoplasmic reticulum stress protects against lipopolysaccharide-induced astrocytic activation and blood-brain barrier hyperpermeability. Front Cell Neurosci 12:222. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00222

Wang Z, Cao C-J, Huang L-L, Ke Z-F, Luo C-J, Lin Z-W, Wang F, Zhang Y-Q, Wang L-T, Wang Z, Cao C-J, Huang L-L, Ke Z-F, Luo C-J, Lin Z-W, Wang F, Zhang Y-Q, Wang L-T (2015) EFEMP1 promotes the migration and invasion of osteosarcoma via MMP-2 with induction by AEG-1 via NF-κB signaling pathway. Oncotarget 6:14191–14208. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.3691

Wei H, Chadman KK, McCloskey DP, Sheikh AM, Malik M, Brown WT, Li X (2012) Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates autism-like behaviors. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis 1822:831–842. https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2012.01.011

Weichhart T (2018) mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. Gerontology 64:127–134. https://doi.org/10.1159/000484629

Wenzel TJ, Bajwa E, Klegeris A (2019) Cytochrome c can be released into extracellular space and modulate functions of human astrocytes in a toll-like receptor 4-dependent manner. Biochim Biophys Acta - Gen Subj 1863:129400. https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2019.07.009

Wheeler MA, Clark IC, Tjon EC, et al (2020) MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. Nature 578:593–599. https://doi.org/10.1038/s41586-020-1999-0

Wheeler MA, Jaronen M, Covacu R, Zandee SEJ, Scalisi G, Rothhammer V, Tjon EC, Chao C-C, Kenison JE, Blain M, Rao VTS, Hewson P, Barroso A, Gutiérrez-Vázquez C, Prat A, Antel JP, Hauser R, Quintana FJ (2019) Environmental Control of Astrocyte Pathogenic Activities in CNS Inflammation. Cell 176:581-596.e18. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.12.012

Wiksten M, Väänänen A, Liesi P (2007) Selective overexpression of γ1 laminin in astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis indicates an involvement in ALS pathology. J Neurosci Res 85:2045–2058. https://doi.org/10.1002/JNR.21314

Wilcock DM, Vitek MP, Colton CA (2009) Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease. Neuroscience 159:1055–1069. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.01.023

Wu D, Smyth GK (2012) Camera: A competitive gene set test accounting for inter-gene correlation. Nucleic Acids Res 40:e133. https://doi.org/10.1093/nar/gks461

Wu M, Ye H, Shao C, Zheng X, Li Q, Wang L, Zhao M, Lu G, Chen B, Zhang J, Wang Y, Wang G, Hao H (2017) Metabolomics–Proteomics Combined Approach Identifies Differential Metabolism-Associated Molecular Events between Senescence and Apoptosis. J Proteome Res 16:2250-2261. https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.7B00111

Xie Y, Peng J, Pang J, Guo K, Zhang L, Yin S, Zhou J, Gu L, Tu T, Mu Q, Liao Y, Zhang X, Chen L, Jiang Y (2020) Biglycan regulates neuroinflammation by promoting M1 microglial activation in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage. J Neurochem 152:368–380. https://doi.org/10.1111/JNC.14926

Xu X, Zhang A, Zhu Y, He W, Di W, Fang Y, Shi X (2019) MFG-E8 reverses microglial-induced neurotoxic astrocyte (A1) via NF-κB and PI3K-Akt pathways. J Cell Physiol 234:904–914. https://doi.org/10.1002/JCP.26918

Yang Y, Liu H, Zhang H, Ye Q, Wang J, Yang B, Mao L, Zhu W, Leak RK, Xiao B, Lu B, Chen J, Hu X (2017) ST2/IL-33-Dependent Microglial Response Limits Acute Ischemic Brain Injury. J Neurosci 37:4692–4704. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3233-16.2017

Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci 106:14670–14675. https://doi.org/10.1073/PNAS.0903563106

Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL (1999) Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. Brain Res 830:226–236. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01389-X

Yi W, Clark PM, Mason DE, Keenan MC, Hill C, Goddard WA, Peters EC, Driggers EM, Hsieh-Wilson LC (2012) Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. Science 337:975–980. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1222278

Yoon YS, Byun HO, Cho H, Kim BK, Yoon G (2003) Complex II Defect via Down-regulation of Iron-Sulfur Subunit Induces Mitochondrial Dysfunction and Cell Cycle Delay in Iron Chelation-induced Senescence-associated Growth Arrest. J Biol Chem 278:51577–51586. https://doi.org/10.1074/JBC.M308489200

Yoshioka N, Asou H, Hisanaga SI, Kawano H (2012) The astrocytic lineage marker calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1 (Camsap1): Phenotypic heterogeneity of newly born Camsap1-expressing cells in injured mouse brain. J Comp Neurol 520:1301–1317. https://doi.org/10.1002/CNE.22788

Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A (2010) Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. Genome Biol 11:R14. https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-2-r14

Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou LL, Giffard RG, Barres BA (2012) Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. J Neurosci 32:6391–6410. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012

Zhang G, Zhong J, Lin L, Liu Z (2021) Loss of ATP5A1 Enhances Proliferation and Predicts Poor Prognosis of Colon Adenocarcinoma. Pathol Res Pract 230:153679. https://doi.org/10.1016/J.PRP.2021.153679

Zhang JF, Wang P, Yan YJ, Li Y, Guan MW, Yu JJ, Wang XD (2017) IL-33 enhances glioma cell migration and invasion by upregulation of MMP2 and MMP9 via the ST2-NF-κB pathway. Oncol Rep 38:2033–2042. https://doi.org/10.3892/OR.2017.5926/HTML

Zhang Q, Yang L, Guan G, Cheng P, Cheng W, Wu A (2020a) LOXL2 Upregulation in Gliomas Drives Tumorigenicity by Activating Autophagy to Promote TMZ Resistance and Trigger EMT. Front Oncol 10:2365. https://doi.org/10.3389/FONC.2020.569584

Zhang T, Li N, Sun C, Jin Y, Sheng X (2020b) MYC and the unfolded protein response in cancer: synthetic lethal partners in crime? EMBO Mol Med 12:e11845. https://doi.org/10.15252/EMMM.201911845

Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keeffe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ (2014) An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. J Neurosci 34:11929–11947. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014

Zhang Z, Ma Z, Zou W, Guo H, Liu M, Ma Y, Zhang L (2019) The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions. Biomed Res Int 2019:9605265. https://doi.org/10.1155/2019/9605265

Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu Z Bin (2019) Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). Int J Mol Med 44:3–15. https://doi.org/10.3892/IJMM.2019.4188

Zhou Z, Austin GL, Young LEA, Johnson LA, Sun R (2018) Mitochondrial Metabolism in Major Neurological Diseases. Cells 7:229. https://doi.org/10.3390/CELLS7120229

Zhu C, Xu B, Sun X, Zhu Q, Sui Y (2016) Targeting CCR3 to Reduce Amyloid-β Production, Tau Hyperphosphorylation, and Synaptic Loss in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. Mol Neurobiol 54:7964–7978. https://doi.org/10.1007/S12035-016-0269-5

Zhu X, Chen Z, Shen W, Huang G, Sedivy JM, Wang H, Ju Z (2021) Inflammation, epigenetics, and metabolism converge to cell senescence and ageing: the regulation and intervention. Signal Transduct Target Ther 6:245. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00646-9

Statements and Declarations

Author contributions

D. C.: Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Visualization, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing; P. D.-A.: Conceptualization, Methodology, Investigation; R. D.: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Review & Editing; M. D. S.: Investigation, Writing - Review & Editing; P. D.: Resources, Final drafting collaboration; E. S.: Resources, Writing - Review & Editing; H. E.: Conceptualization, Writing - Review & Editing; J. A. A.-C.: Conceptualization, Writing - Review & Editing; F. A.: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing.

Funding

This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (grant numbers: POS_NAC_2017_1_140673, MOV_CA_2018_1_149736, PD_NAC_2018_1_149726), UK Embassy in Montevideo (grant number: UK_ID_2015-1-7), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), and Comisión Académica de Posgrado (CAP).

Competing Interests

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

1.1.1. Material suplementario 1 publicación transcriptómica

Para acceder al material suplementario 1 siga este **vínculo**.

1.1.2. Material suplementario 2 publicación transcriptómica

Para acceder al material suplementario 2 siga este **vínculo**.

1.1.3. Material suplementario 3 publicación transcriptómica

Para acceder al material suplementario 3 siga este **vínculo**.

1.2. Manuscrito metabolómica: "*Untargeted Metabolomics of 3xTg-AD Neurotoxic Astrocytes*", Carvalho et al. 2023

Untargeted Metabolomics of 3xTg-AD Neurotoxic Astrocytes

Diego Carvalho[1], Pablo Diaz-Amarilla[2], Mathew R. Smith[3,4], Rosina Dapueto[2], María Daniela Santi[2], Marcela Martinez-Busi[1], Young Mi-Go[3], Dean P. Jones[3], Eduardo Savio[2], Henry Engler[2], Juan A. Abin-Carriquiry[1,5**], Florencia Arredondo[1,2*]

[1] Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay

[2] I&D Biomédico y Químico Farmacéutico, Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), Montevideo, Uruguay

[3] Division of Pulmonary, Allergy, Critical Care and Sleep Medicine; Department of Medicine; Emory University, GA, USA

[4] Atlanta Veterans Affairs Healthcare System, Decatur, GA, USA

[5] Laboratorio de Biofármacos, Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

* Corresponding author. I&D Biomedico y Químico Farmacéutico, Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), Montevideo, Uruguay.

** Corresponding author. Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay.

E-mail addresses: florencia.arredondo@cudim.org (F. Arredondo), ja.abin@gmail.com (J.A. Abin-Carriquiry).

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia, affecting around 47M people worldwide. Histological characteristics and gene risk factor among other evidences originated the amyloid hypothesis of the disease. This neuronocentric paradigm is currently suffering a shift considering the evidence of the role of other cellular types like microglia and astrocytes in disease progression. In our previous works we described a particular astrocytic subtype obtained from 3xTg-AD murine model which shows neurotoxic properties *in vitro*. We continue here our exploratory analysis through metabolomics lens in order to identify potentially disturbed metabolites and biological pathways.

Cell extracts from neurotoxic and control astrocytes were compared using high resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry-based metabolomics. Up to 1041 metabolic features

demonstrated significant differences between neurotoxic and control astrocytes including alteration in key metabolite glutamate. The present results illustrate many metabolite homeostatic and regulatory functions, suggesting then that 3xTg-AD neurotoxic astrocytes present important alterations in energy metabolism as well as inflammatory pathways, also supported by our previous transcriptomics results.

This is the first metabolomics study performed in 3xTg-AD neurotoxic astrocytes. The results show insights into metabolic disruptions potentially associated with neurotoxicity and pathology progression in the 3xTg-AD mouse model and strengthen the therapeutic potential of astrocytes in AD.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative pathology characterized by memory loss, spatial and temporal disorientation and progressive cognitive decline (Blennow et al., 2006; Reitz & Mayeux, 2014). Histologically it is characterized by the presence of amyloid plaques and neurofibrillary tangles as a result of the extracellular deposition of amyloid beta protein and intraneuronal aggregation of hyperphosphorylated tau protein, respectively (Blennow et al., 2006; Reitz & Mayeux, 2014). Even though most cases are idiopathic, various gene risk factors have been discovered, mainly related to amyloid protein synthesis and processing (Blennow et al., 2006; Reitz & Mayeux, 2014). These evidences go in line with the amyloid hypothesis, traditionally assessed from a neuronocentric point of view. In this sense an imbalance between production and elimination of amyloid beta would trigger inflammatory and oxidative stress processes that finally lead to loss of synaptic integrity, neuronal connectivity and ultimately progressive regional neurodegeneration (Selkoe & Hardy, 2016).

Even though one of the main focuses of research has been the role of tau and amyloid beta protein aggregates on neuronal death it is well recognized that AD pathology is multifactorial, involving an interplay of many risk factors and processes like vascular pathology, inflammation and metabolic alterations (Heneka et al., 2015; Trushina et al., 2013; Zlokovic, 2005). These have prone the necessity to further study the role of other important cell actors like glia and their associated processes. In particular, astrocytes are glial cells with key roles in brain homeostasis like synapse regulation, trophic supply and debris cleaning among others (Sofroniew & Vinters, 2010). Astrocytes respond towards tissue damage assuming different phenotypes broadly known as astrocyte reactivity or astrogliosis (Sofroniew, 2020). In that sense multiple studies point towards early imbalances in astrocyte function and morphological changes associated with AD progression, as well as their contribution on both in neuroinflammation and neuroprotection in various brain diseases and models (Díaz-Amarilla et al., 2011; Liddelow & Barres, 2017; Medeiros & LaFerla, 2013; Siracusa et al., 2019; van Gijsel-Bonnello et al., 2017).

Transgenic mouse models are invaluable tools to improve our understanding of diseases. In the present work we use the 3xTg-AD mouse model of AD which replicates many features of the disease including plaque and tangle pathology, age cognitive deficits, astrocyte reactivity and brain atrophy. In previous studies, we isolated and cultivated astrocytes from cortex and hippocampus of symptomatic 10 months-old 3xTg-AD mice which presented a high proliferation rate, a differential expression of astrocyte markers, and the capacity to mediate neuronal degeneration (Diaz-Amarilla et al., 2022). The results added evidence to the hypothesis that microenvironmental-induced changes in astrocyte function during the disease progression may promote or accelerate neurodegeneration.

In the present work we expand the description of these neurotoxic astrocytes through metabolomics lens. Metabolomics is an emerging discipline interested in the study of the global collection of small molecules in the body or cells which reflects the combined effect of genetic factors and environmental exposures on the phenotype (Li et al., 2016). In particular untargeted approaches do so without a priori knowledge of the metabolites involved. One currently untargeted strategy of high resolution metabolomics, generally involves the use of liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry to accurately separate and detect mass and abundance of distinct metabolic features. We

used this approach to identify metabolites and metabolic pathways altered in 3xTg-AD neurotoxic astrocytes. We subsequently validated changes in key metabolic hubs by a targeted approach. Apart to suffice growth and energy demands, metabolites regulate systemic functions like inflammation (Husted et al., 2017; Man et al., 2017). The present results illustrate these features. Pathway analysis suggested a number of associated biological processes, mainly related to amino acid and central carbon metabolism, as well as arachidonic acid metabolism. In addition metabolome-transcriptome associations supported these findings (Carvalho et al., 2022).

2. Methods

2.1. Animals

Animal procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (CEUA-CUDIM) in accordance with the international guidelines followed by the National Animal Experimentation Committee (CNEA) for the use of live animals. As in previous work, homozygous 3xTg-AD (B6;129-Tg(APPSwe, tauP301L)1Lfa Psen1$^{(tm1Mpm)}$/Mmjax strain) mice (Oddo et al., 2003)(Oddo et al., 2003) and non-transgenic wild-type (Non-Tg) mice were Female mice (strain C57BL/6J) were bred (The Jackson Laboratory) and housed in a CUDIM SPF centralized animal facility with a 12-h light-dark cycle and ad libitum access to food and water (Diaz-Amarilla et al., 2022).

2.2. Astrocyte cultures from adult and neonatal mice

Neurotoxic astrocyte cultures were prepared from the cerebral cortex and hippocampus of 9-10-months-old 3xTg-AD mice according to the methods previously described (Diaz-Amarilla et al., 2022). Processed cells were plated in tissue flasks; culture medium was removed after 7 days in vitro (DIV) and replaced every 3-4 days. At 21-28 DIV cells were passaged for the first time. Non-toxic control astrocyte cultures were derived from cerebral cortex and hippocampus of neonatal (postnatal day 0-2) 3xTg-AD and non-Tg (C57BL/6J) mice following the methods described by Cassina et al. with minor modifications (Cassina et al., 2002; Diaz-Amarilla et al., 2022). Once plated, cell culture medium was changed once every 2-3 days. Contaminant cells were removed at 10 DIV by manual shaking followed by cytosine arabinoside treatment. All cell cultures were amplified and maintained at 37 °C in a humidified 5 % CO_2 incubator. Astrocytes isolated from 9-10-months-old non-Tg mice were not used in our studies due to low yield achieved (Diaz-Amarilla et al., 2022). See further details in (Diaz-Amarilla et al., 2022).

2.3. *Sample collection and pre-processing*

Metabolite extraction from cultured cells was performed based on previous works of Go and col. (2015) as well as Sapcariu and col. (2014) (Go et al., 2015; Sapcariu et al., 2014). A sample consisted of metabolites extracted and pooled from 3 wells of a 6 well plate, gathering a total of 9 samples per condition. Briefly, confluent cells were washed with 0.9 % (m/v) NaCl at room temperature, followed by addition of 300 uL of ice-cold HPLC grade water-acetonitrile solution mixture (1:2) to each plate well to scrape cells, precipitate proteins and extract metabolites. Extracts were maintained at 4 °C for 30 min. and were centrifuged at 16100 g for 10 min to remove protein and any remaining insoluble fraction.

Supernatants were transferred to screw cap vials and dried in a speed vacuum centrifuge (overnight, 35 °C).

2.4. High resolution metabolomics

Dried samples were reconstituted with 300 uL of 1:2 HPLC grade water: acetonitrile solution mixture containing an internal isotopic standard mixture (Frediani et al., 2014; Soltow et al., 2013). Samples were mixed (10 s vortex) and placed agitated at 4 °C (overnight) previous to centrifugation to remove any remaining protein. The resulting supernatant was transferred to low volume autosampler vials, maintained at 4 °C and analyzed in triplicate. Data were collected on a High Field Q Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher) mass spectrometer, coupled with dual liquid chromatography. Acquisition was done alternating between hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) with electrospray ionization (ESI) source operated in positive mode and reverse phase chromatography (C18) with ESI operated in negative mode (resolution 120K, scan range set to 85-1275 m/z, 10 µL injection volume, 5 min. runtime per injection). Ultra-high resolution mass spectrometry operating at 60000 and 120000 resolution have previously been shown to provide effective quantification of metabolites in biologic extracts (Liu et al., 2016), and the use of complementary chromatography phases and polarity of ionization has been shown to improve detection of endogenous and exogenous chemicals.

2.5. Metabolomics data processing and statistical analysis

Raw files of mass spectral data were converted to computable document format (CDF) using Xcalibur file converter software (Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA) for further processing. The data were processed for peak extraction, noise filtering, m/z and retention time alignment, and quantification of ion intensities using apLCMS (Yu et al., 2009) with enhanced data extraction using xMSanalyzer (Uppal et al., 2013). xMSanalyzer improves feature detection by performing systematic data re-extraction, statistical filtering, and merging (Uppal et al., 2013). The metabolite values were summarized by the median for triplicates and subjected to quality assessment. Samples were filtered considering an overall Pearson correlation of technical replicates of (r) > 0.70 and coefficient of variation cutoff of 75 %. Considering the amount of missing values one sample outlier was further removed from both C18 and HILIC cell extract feature tables. Data were log2 transformed and quantile normalized for subsequent analysis. Log transformation reduces heteroscedasticity, such that each metabolite has a mean of 0 and standard deviation of 1, and quantile normalization reduces between-sample variability (Kohl et al., 2012). Obtained datasets were then used for the statistical analysis.

Principal component analysis (PCA) was performed using R packages implemented on MetaboAnalyst server to visualize group distribution according to the variation in feature intensity patterns across all samples. Selection of differentially expressed m/z features was performed using linear model for microarray data (LIMMA) analysis (Ritchie et al., 2015). A Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) of 20 % was then applied to adjust for multiple comparisons and to identify those metabolites of greatest interest (Hochberg & Benjamini, 1990). To visualize distributions of differentially expressed features, color coded heatmap with the two-way hierarchical cluster analysis (HCA) was performed using the hclust function in R to determine the clustering pattern of selected m/z features and samples.

All statistical and computational analysis was performed in R software (R Project for Statistical Computing, Vienna Austria).

2.6. Metabolite feature annotation and pathway enrichment analysis

Metabolite features were annotated using two approaches. On one hand, features were annotated by searching metabolic databases Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Human Metabolome Database (HMDB) for putative matches to known metabolites using R package xMSannotator with m/z threshold (±5 ppm) (Kanehisa et al., 2021; Uppal et al., 2017; Wishart et al., 2013). xMSannotator uses a multilevel clustering procedure based on feature intensity across all samples, retention time, mass defect, isotope/adduct patterns, intensity correlations between samples, and biochemical pathway knowledge to assign confidence levels on annotations (Uppal et al., 2017). We prioritized levels 2 (medium confidence) and 3 (high confidence). On the other hand, discriminating features were processed via Mummichog 2.0 (available in the public domain at http://mummichog.org/), a program that performs putative metabolite annotation and pathway enrichment analysis in one step (Li et al., 2013). A biological process is expected to favor a more connected network over random distributions. This procedure then assigns putative metabolite matches based on pathways that are enriched within the metabolite set. Mummichog uses a reference model derived from integration of KEGG, UCSD Recon1, and Edinburgh human metabolic networks. Features differing at $p < 0.05$ were selected, permutation testing ($p < 0.05$) was used in pathway enrichment analysis, and 5 ppm threshold was used for feature matching. Meaningful pathways were further selected if they including minimum of 4 matched metabolites. Annotations were manually checked for consistency between both procedures. Some annotations were further supported based on adduct, m/z and retention time comparison against an in-house database of previously confirmed metabolites (Liu et al., 2020).

2.7. Metabolome – transcriptome associations with xMWAS

The metabolomics data presented were integrated with preceding transcriptomics data (n = 3) from 3xTg-AD astrocytes by using xMWAS, an integration program based on the sparse partial least squares (sPLS) regression method (Uppal et al., 2018). sPLS is a regression based modeling approach which performs simultaneous variable selection and data integration (Hyonho Chun & Keleş, 2010). In addition, the software performs community detection (groups of nodes heavily connected with other nodes in the same community, but with sparse connections with the rest of the network) using the multilevel community detection algorithm (Blondel et al., 2008). All data was log-transformed, specifically transcriptomics data was also voom-normalized and metabolic features were previously quantile normalized. To compensate for the fact that these data sets proceeded from different samples data tables were expanded to generate all possible matching combinations. Thresholds for determining significant associations were set as the following: correlation threshold $|r| > 0.6$ and $p < 0.05$ as determined by Student's t-test.

2.8. Targeted metabolite detection

Selected metabolites were validated by targeted detection (Liu et al., 2020). Briefly, astrocytic cell culture extracts were processed as previously described and selected amino acids GABA and glutamate were detected according to the method of Soo Hyun Park and col. (Thermo Scientific, application note 73151) on a UHPLC- ISQ™ EC Single Quadrupole Mass Spectrometer system.

3. Results and discussion

3.1. Untargeted metabolomics distinguishes symptomatic 3xTg-AD mice-derived astrocytes from those obtained from pre-symptomatic 3xTg-AD neonates

Untargeted metabolomics of cell extracts from "old" neurotoxic 3xTg-AD (Tg.Old), neonatal 3xTg-AD (Tg.Neo) and neonatal wild type (Wt.Neo) astrocytes was performed under two analytical schemes, C18 column based chromatography with negative ionization mode (C18-) and HILIC column based chromatography with positive ionization mode (HILIC+) respectively. Principal component analysis of metabolites found in cell extracts detects features with discriminatory value, even though these encompassed around 10 % of the variation observed which could translate in a relatively small amount of discriminant metabolites (Figure 1). Remaining components include similar amount of variation (not shown). As done in our previous transcriptomic study of neurotoxic astrocytes, we included Wt.Neo astrocytes as an additional control. In agreement with such study it can be appreciated that both Wt.Neo and Tg.Neo astrocytes behave similarly (Figure 1), presenting an almost complete overlap of all principal components of the score plot (not shown). Discriminatory features were assessed comparing Tg.Old astrocytes against Tg.Neo astrocytes.

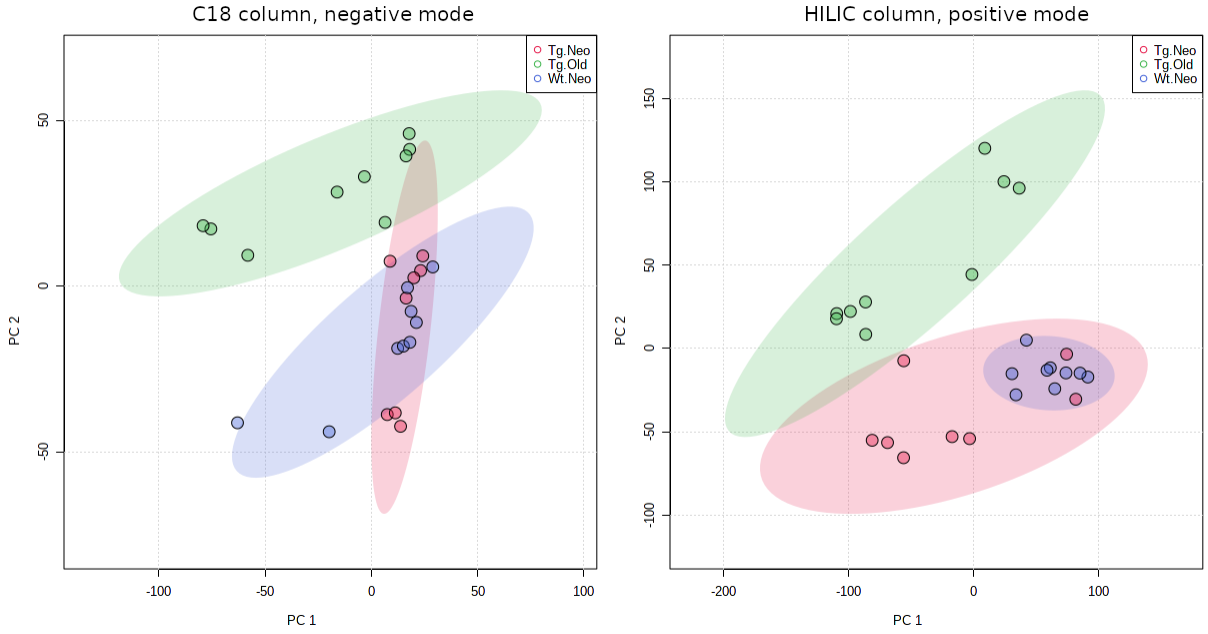


Fig. 1 Principal component analysis (scores plot) of metabolites detected in cell extracts neurotoxic and neonatal astrocytes of 3xTg-AD model. Left: metabolites detected with C18 column based chromatography and negative

ionization mode, right: metabolites detected with HILIC column based chromatography and positive ionization mode. Figure rendered with MetaboAnalyst server (Pang et al., 2021)

Around 5k and 6k detected features on C18- and HILIC+ acquisitions respectively met the filtering criteria. Differentially expressed features were selected using limma statistics with a lenient threshold of FDR <0.2, resulting in around 400 and 1000 features from C18- and HILIC+ data sets respectively. Heat maps from both C18- and HILIC+ data sets showed significant clustering of neurotoxic 3xTg-AD astrocytes separated from neonatal 3xTg-AD astrocytes illustrating the reproducibility of the patterns within each group and their discriminant value (Figure 2, upper panel). Distribution of discriminatory features along m/z dimension can be visualized using Manhattan plots (Figure 2, lower panel), indicating similar chemical properties with the rest of the metabolic features in the datasets. Similar behavior can be observed along retention time dimension (not shown). Around 36 % of selected C18- and 38 % of selected HILIC+ features are up-regulated.

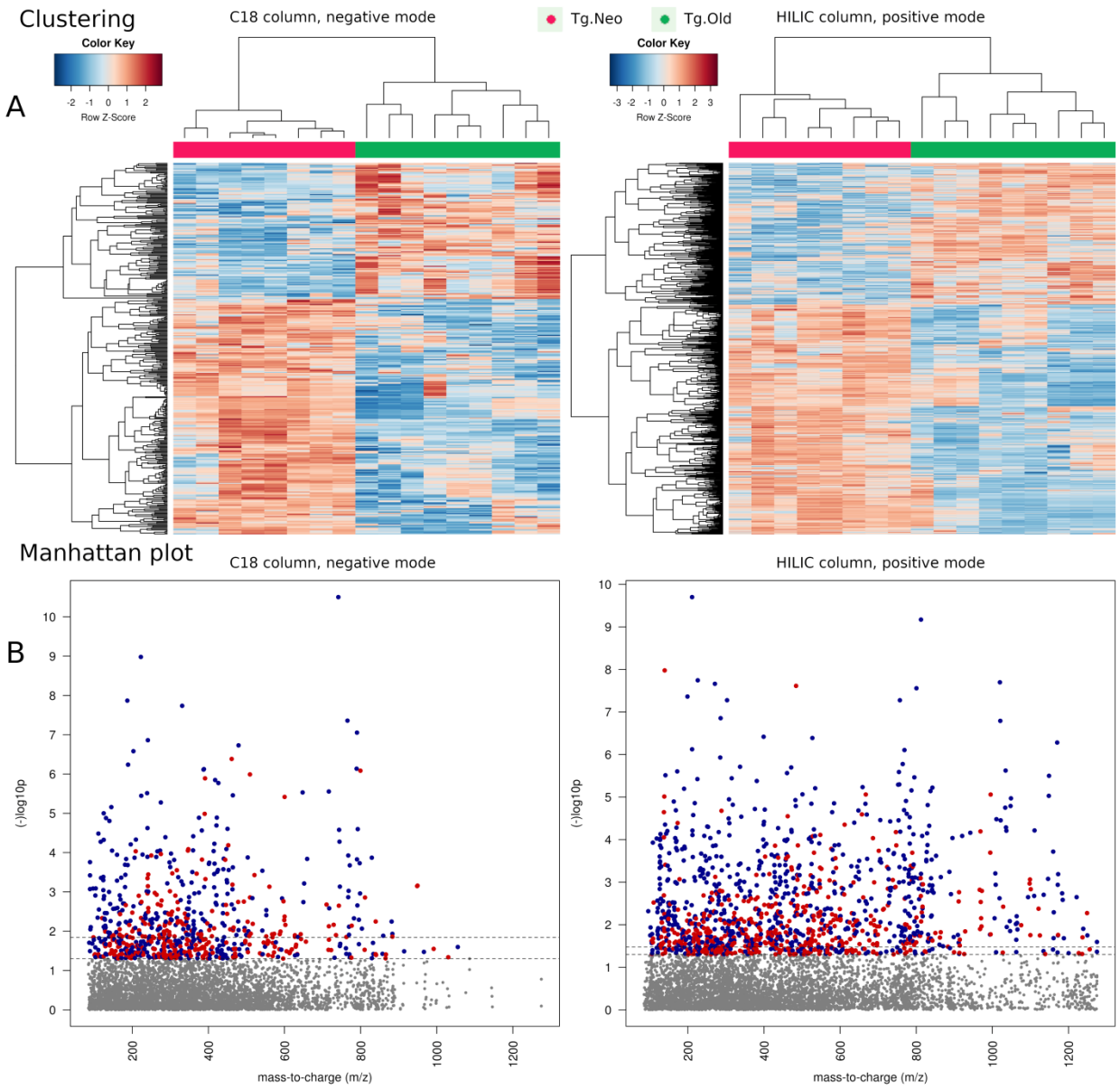


Fig. 2 Differentially expressed metabolic features detected in cell extracts of neurotoxic and neonatal astrocytes from 3xTg-AD model (LIMMA analysis). A. Clustering analysis (all significant features in rows, samples in columns). B. Type 1 Manhattan plot presenting the negative log10(*p*-value) of metabolite features as a function of their mass/charge ratio. Left: metabolites detected with C18 column based chromatography and negative ionization mode, right: metabolites detected with HILIC column based chromatography and positive ionization mode. From bottom-up, features above the first dashed horizontal line were significant at a *p*-value < .05, and above the second dashed line significant at *q*-value (FDR) < 0.2. A total of 382 features were selected out of 5294 filtered features detected by C18 column based chromatography and negative ionization mode. A total of 1041 features were selected out of 6189 filtered features detected by HILIC column based chromatography and positive ionization mode. Red: higher expression in neurotoxic astrocytes; blue: lower expression. Abbreviation: LIMMA, linear models for microarray data

3.2. Associations between altered metabolic and signaling pathways

Mummichog pathway analysis was performed to identify altered biochemical pathways and obtain metabolite annotations for differentially expressed features potentially involved in them. Figure 3 presents a list of pathways detected by this procedure. Considering overlapping pathways, results from C18 dataset can be summarized as pathways linked to the central carbon metabolism and amino acid metabolism like *Glycine, serine, alanine and threonine*, *Glutamate metabolism*, and *Glycolysis and gluconeogenesis*. Results from HILIC dataset include pathways related to *Arachidonic acid metabolism* in addition to pathways related to amino acid metabolism. Identified pathways are among the most relevant hubs of astrocyte metabolism as it will be discussed later. Associated metabolite annotations were supplemented with results from xMSAnnotator. Up to a 100 differentially expressed features from C18 and HILIC datasets were annotated with medium and high confidence levels (see Supplementary Table 1). Annotations were further supported by comparison with an in house list of previously validated metabolites (Liu et al., 2020) as it is presented in Table 1. These most confident annotated metabolites illustrate and support previously found pathways.

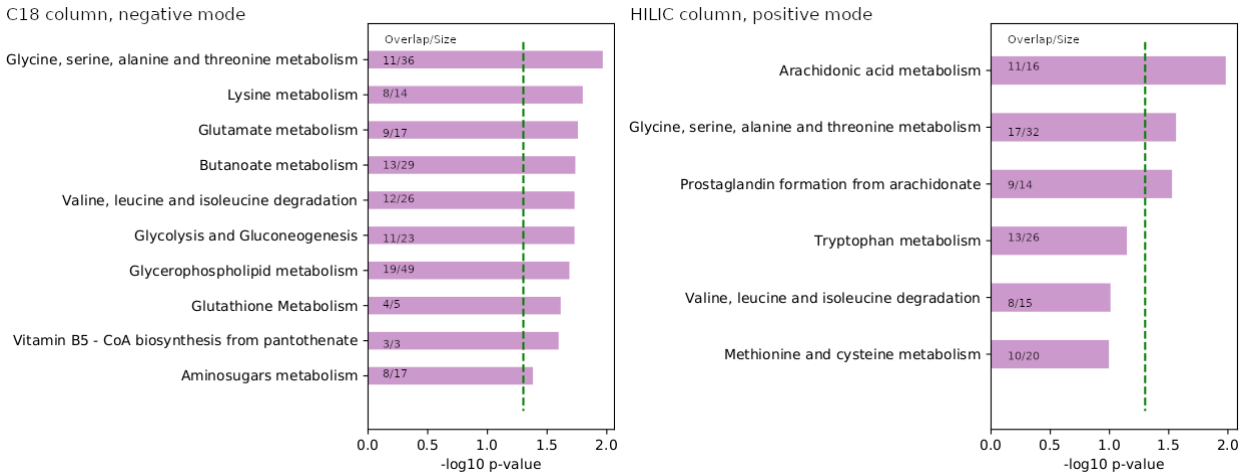


Fig. 3 Mummichog pathway analysis of differentially expressed metabolic features. Size corresponds to the total number of metabolites known in a given pathway, and overlap corresponds to the number of matching metabolic features found to be differentially expressed. Pathways were consider to differ between groups if $p \leq 0.05$ and overlap > 4

Table 1 Pre-validated cell metabolites detected by high resolution metabolomics. Selected metabolite annotations are supported based on comparison with an in-house database of previously confirmed metabolites (similar adduct, m/z and retention time) (Liu et al., 2020). Pathway information gathered from Mummichog results and KEGG metabolite annotations

CELL METABOLITES								
Chemical ID	**Confidence**	**Mz**	**time**	**P value**	**Max fold change (log2)**	**Name**	**Adduct**	**Pathways**
C05984	2	103.0400	48.5	0.0012	-0.93	2-Hydroxybutyrate	M-H	Butanoate metabolism
C03761	2	161.0456	50.9	0.0026	-1.72	3-Hydroxy-3-methylglutarate	M-H	
C01879	3	130.0499	94.4	0.0004	-1.82	5-Oxoproline	M+H	Glutathione metabolism
C06428	3	301.2175	191.7	0.0055	0.94	Eicosapentaenoic acid	M-H	
C02693	2	175.0866	64.6	0.0292	-0.80	Indole-3-acetamide	M+H	Tryptophan metabolism
C00637	3	158.0611	78.3	0.0106	-1.16	Indoleacetaldehyde	M-H	Tryptophan metabolism
C00025	3	147.0490	33.7	0.0138	1.72	L-Glutamate	M-H_[-1]	Glutamate metabolism
C00186	3	89.0244	46.1	0.0002	-1.55	L-Lactate	M-H	Glycolysis and gluconeogenesis
C00149	2	133.0143	46.4	0.0035	-1.49	L-Malate	M-H	Glycolysis and gluconeogenesis
C00065	2	106.0499	116	0.0165	-2.27	L-Serine	M+H	Glycine, serine and threonine metabolism
C00078	2	203.0826	50.2	0.0023	-1.61	L-Tryptophan	M-H	Glycine, serine and threonine metabolism
C00624	2	188.0565	35.9	0.0002	-2.14	N-Acetyl-L-glutamate	M-H	Arginine biosynthesis
C01004	2	138.0550	81.8	0.0123	2.37	N-Methylnicotinate	M+H	Nicotinate and nicotinamide metabolism
C00153	3	123.0553	58.7	0.0210	-2.42	Nicotinamide	M+H	Nicotinate and nicotinamide metabolism
C02862	2	232.1541	77.5	0.0178	-1.78	O-Butanoylcarnitine	M+H	
C03017	2	218.1386	82	0.0000	-4.90	O-Propionylcarnitine	M+H	
C00245	2	126.0220	78.9	0.0005	-2.94	Taurine	M+H	Neuroactive ligand-receptor interaction

As supporting evidence for the present results we set out to more comprehensively study the associations between the current untargeted metabolomics data and our previously reported gene expression data (Carvalho et al., 2022). We specifically used xMWAS multi-omics approach which can potentially identify concomitant or interlaced changes between distinct regulatory levels. Correlated discriminant metabolites and transcripts (differentially expressed genes, DEGs) were then obtained.

Consistency of xMWAS results with previous analysis was verified using overrepresentation analysis of DEGs on the STRING web server. Overrepresented KEGG pathways obtained from up-regulated DEGs included *Protein processing in endoplasmic reticulum*, *RNA transport*, *Toll-like receptor signaling pathway*, *NF-kappa B signaling pathway*, *Toxoplasmosis*, *N-Glycan biosynthesis*, *Folate biosynthesis*; and from down-regulated DEG: *Adherens junction*, *Glycine, serine and threonine metabolism*, *Rap1 signaling pathway* and *cAMP signaling pathway* among others. In this sense results are consistent with previous findings and highlight DEG that could be involved in the detected metabolic pathways. Among these DEGs, various metabolic enzymes included can be grouped into those linked to metabolism of fatty acids and related compounds (sphingolipids, glycosphingolipids, arachidonic acid), central carbon metabolism (oxidative phosphorylation, metabolism of amino acids, etc.), N-glycan and glycosaminoglycan biosynthesis, and folate metabolism (Figure 4). Even though these groups include both up and down-regulated DEGs, members of the carbon metabolism and fatty acids are mainly down-regulated; while N-glycan, glycosaminoglycan and folate metabolisms are mainly up-regulated. Additionally, some enzymes related to sphingolipid and arachidonic acid metabolism are up-regulated. Selected metabolites reflect these changes: there is a general down-regulation of fatty acyls, glycerophospholipids and carboxylic acids among other metabolites, and up-regulation of a few metabolites like Leukotriene A4. A subset of representative correlated metabolites is presented in Figure 5 (see full list of medium and high confidence annotated metabolites in Supplementary Table 2). Considering this broad view it is worth noting that suggested alterations in the endoplasmic reticulum (ER) could be the basis of the metabolic changes observed. ER is the main cell compartment involved in protein traffic and folding among other functions. Failure in the adaptive capacity of the ER results in activation of stress responses (Unfolded Protein Response) that in different context can result in activation of pro-inflammatory pathways, metabolic alterations and increased proliferation (Miller et al., 2012; Sheng et al., 2019; Sprenkle et al., 2017; Zhang et al., 2020). Cancer cells illustrate many of these changes, for example through the action of transcription factor c-Myc, which quite interestingly appears to be up-regulated in Tg.Old astrocytes according to transcriptomics data. ER stress related disturbances are also critical in chronic metabolic diseases like obesity and type 2 diabetes, being then an interesting therapeutic target (Hotamisligil, 2010; Martin-Jiménez et al., 2017; Yadav et al., 2014).

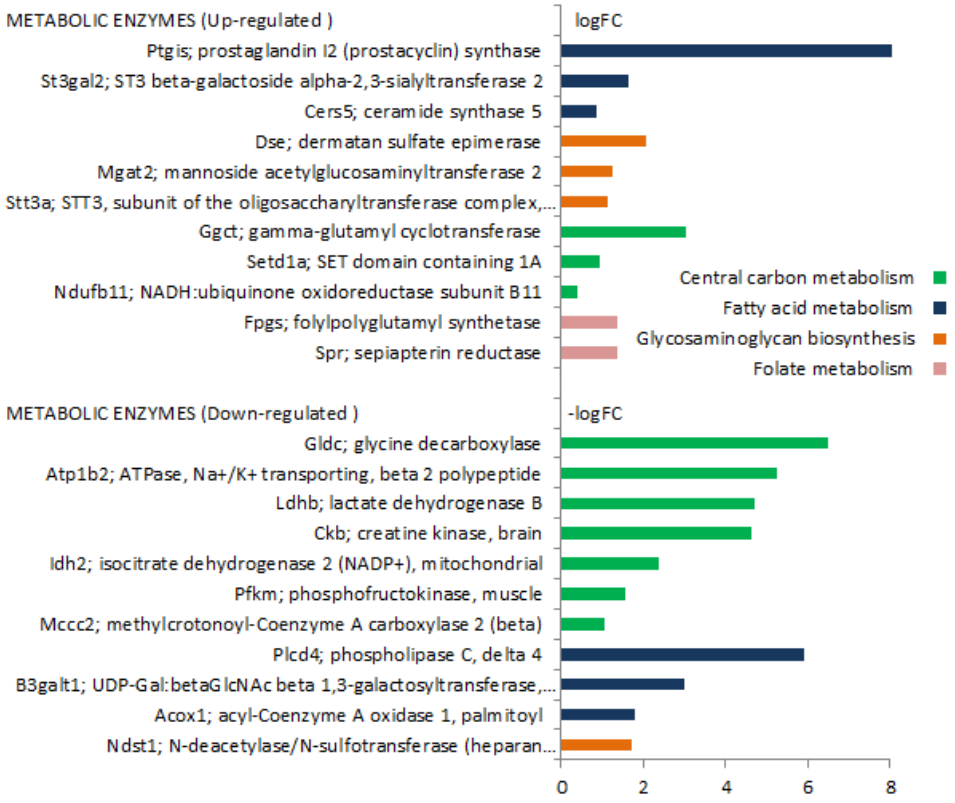


Fig. 4 Selected enzymes based on xMWAS association analysis between transcriptome and metabolome. Enzymes colored in blue are associated with the metabolism of fatty acids and related compounds (sphingolipids, glycosphingolipids, arachidonic acid); green: central carbon metabolism (oxidative phosphorylation, metabolism of amino acids, etc.); orange: N-glycan and glycosaminoglycan biosynthesis; purple: folate metabolism. For brevity only some representative members are shown

3.3. Key metabolite alterations involved in astrocyte energetics and signaling

Presented results indicate perturbations at essential hubs of brain homeostasis, including energy metabolism, redox metabolism, signaling and inflammatory processes. In Figure 5 we present a few representative confidently annotated metabolites that illustrate these changes. We discuss in this section the role and possible impact of these changes in homeostasis and disease process. In particular the change in the aminoacid glutamate is probably among the most relevant for astrocyte function (Hertz & Rothman, 2017; Magistretti, 2006) and verified this particular alteration by a targeted approach (Figure 6). Glutamate is involved in a number of functions in the central nervous system, as an energy metabolite and neurotransmitter. Glutamate released by neurons is uptaken by astrocytes where it is converted into glutamine by the enzyme glutamine synthetase and the latter returned to neurons. Inversely, glutamine can be converted to glutamate by glutaminase (Gls). Consistently with the increased abundance of glutamate in neurotoxic astrocytes this enzyme appears to be up-regulated according to RNA-seq data (Carvalho et al., 2022). Part of the accumulated glutamate can also be subjected to oxidative degradation. Glutamate imbalance is associated to neurotoxicity as it promotes oxidative stress and inflammation through different mechanisms like direct receptor interaction and

promotion of arachidonic acid metabolism or glutathione deprivation (Herrera et al., 2001). This phenomenon has been observed in various neurodegenerative diseases including AD and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) (Schubert & Piasecki, 2001; Shaw et al., 2001). In this regard, inhibition of glutaminase by compounds like bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES) is then an interesting therapeutic avenue. Apart from increased glutamate levels, altered levels of serine and tryptophan among other metabolites have been associated with inflammation and oxidative stress in the nervous system, a feature that could emerge from increased amino acid catabolism (Davis & Liu, 2015; Griffin & Bradshaw, 2017; Hajsl et al., 2020; Kim et al., 2019; Tefera & Borges, 2018; Waagepetersen et al., 2009).

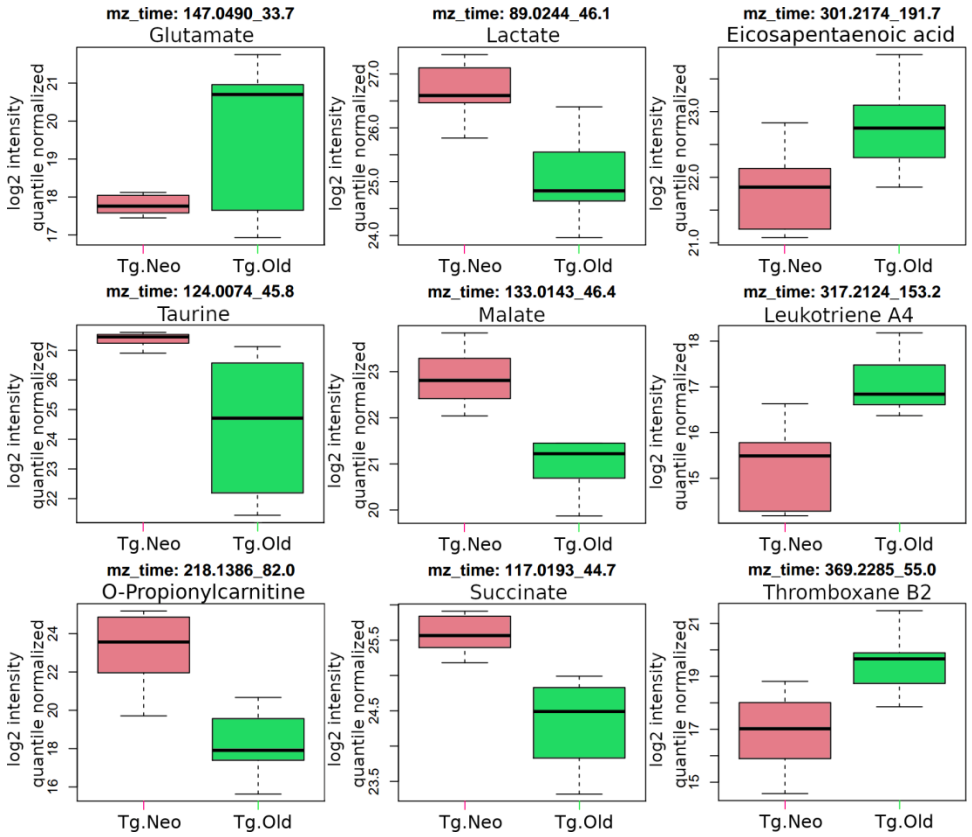


Fig. 5 Box plot of selected metabolites from high resolution metabolomics. Presented metabolites are a subset of metabolites correlated to the astrocytic transcriptomic profile based on xMWAS association analysis, and with previously validated annotations and/or xMSAnnotator medium-high confidence annotations. See full list in Supplementary Table 2

In addition to glutamate detected in the metabolomic study, we also specifically evaluated gamma aminobutyric acid (GABA), another important energy metabolite and neurotransmitter cycled between astrocytes and neurons, which appears to have a higher abundance in neurotoxic astrocytes. Aberrant production of GABA by monoamine oxidase-B (MAO-B) has been observed in reactive astrocytes and could be associated with memory impairment in AD mouse models (Heejung Chun et al., 2018; Jo et al., 2014). Multiple MAO-B inhibitors have been proposed for the treatment of AD (Behl et al., 2021) supported by the fact that perturbations in this enzyme have been related to AD and Parkinson

pathology (An et al., 2021; Gulyás et al., 2011). In our previous study, we observed a notable increase in the level of MAO-B protein in 3xTg-AD neurotoxic astrocytes, although not statistically significant (Diaz-Amarilla et al., 2022). It has been hypothesized that increased astrocyte GABA content could arise at early stages of AD as a coping mechanism to reduce plaque-mediated neuronal hyperactivity, so further research is necessary to clarify its therapeutic potential (Acioglu et al., 2021; Assefa et al., 2018).

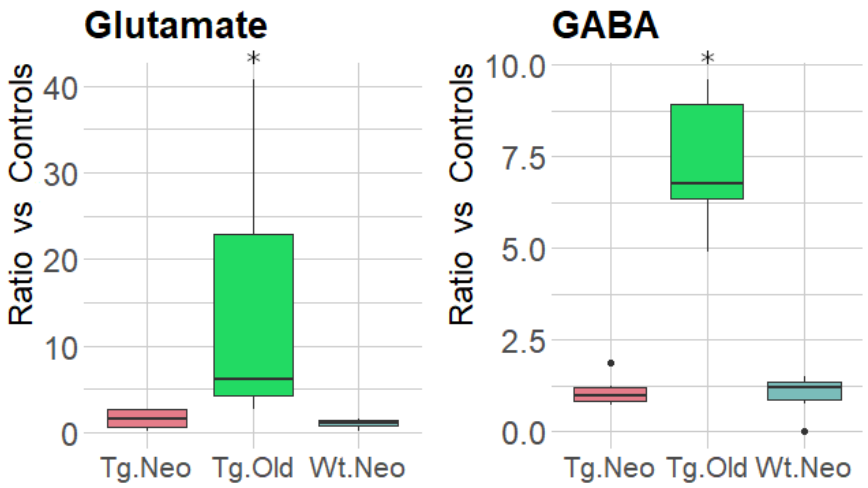


Fig. 6 Validated amino acid perturbations in astrocyte cell extracts. Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum exact test, with Benjamini-Hochberg p-value adjustment procedure. * adjusted p-value < 0.05 for comparison of Tg.Old vs Tg.Neo and Tg.Old vs Wt.Neo

Other high confidence annotations indicate a net decrease of TCA intermediates lactate, malate (pyruvate can be annotated but with a low confidence score), and possibly an increase in Pentose Phosphate Pathway (PPP) metabolite phosphoribosyl pyrophosphate (see Supplementary material). The PPP produces nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, a necessary cofactor for restoration of reduced glutathione (Bolaños & Almeida, 2010), cell growth and proliferation (Cho et al., 2018; Hertz et al., 2007). It may play a key role in regulating vascular function by altering ion channel function, promoting cell proliferation, enhancing cholesterol and fatty acid synthesis, modulating immune system function, and increasing oxidation (Gupte, 2010). In neurons it may have a protective function through its effect on oxidative stress (Bolaños & Almeida, 2010; Manolescu et al., 2011).

Previous transcriptomic data suggested a shift from glycolysis to PPP (downregulation of Pfkp, Pfkp, and Pfkfb3), along with a compensatory adjustment in the citric acid cycle toward anabolism (upregulation of Ldha and downregulation of Ldhb), glutaminolysis (upregulation of Glul/GS regulated) and alterations in the respiratory chain (Carvalho et al., 2022). Noteworthy, similar alterations can be seen in other cell types, particularly malignant cells (Chinchore et al., 2017; Valvona et al., 2016; Z. H. Wang et al., 2021). A reduction in lactate, as suggested by the metabolomics results is then unexpected. However, these represent steady-state levels of metabolic intermediates and do not directly inform the associated fluxes, so their interpretation must be considered with caution. Although both results suggest a relative increase in PPP with respect to the glycolytic arm, the net balance between glycolysis and oxidative phosphorylation is more ambiguous. There is evidence of a decrease in some subunits of the respiratory

chain complexes and a probable increase in the formation of supercomplexes that could have opposite effects (Carvalho et al., 2022). These conflicts need to be further evaluated through functional studies.

A decrease in protective metabolites carnitine and taurine is also supported by our results. Carnitine is an amino acid which transfers long-chain fatty acids into the mitochondrial matrix for β-oxidation, producing acetyl-CoA that later enters the TCA cycle. It helps to reduce oxidative stress preventing the accumulation of toxic long chain acyl-CoA metabolites (Derous et al., 2018). Decline in carnitines and genes linked to fatty acid metabolism has been associated with aging in human, mouse and other animal models (Derous et al., 2018; Gómez et al., 2012; Hoffman et al., 2014; Houtkooper et al., 2011). Population studies have linked carnitine decline with increased risk of memory decline and Alzheimer disease (Hajjar et al., 2020; Lodeiro et al., 2014). In this sense supplementation with carnitines could have beneficial effects on senescence (Noland et al., 2009). Taurine has been associated to a number of functions including energy metabolism, ER stress, neuromodulation, and calcium homeostasis for which therapeutic potential has been proposed (Schaffer & Kim, 2018).

Another important alteration arisen from our present results is in the arachidonic acid (AA) metabolism which involves prostaglandins and other mediators of inflammatory responses (Table 1, Figure 4). Annotated metabolites include eicosapentaenoic acid, leukotriene A4, and thromboxane B2 among others (Figure 5, Supplementary Table 1). Neuroinflammation can have both positive and negative effects, and possible neuroprotective effects of certain AA metabolites have been described through activation of PPARgamma cascade (Sambra et al., 2021; Sun et al., 2015; Z. J. Wang et al., 2006). On the other hand, alterations in this cascade have been observed in AD and detrimental effects of associated metabolites have been described in mouse models of the disease (Amtul et al., 2012; Thomas & Olivier, 2016). In addition to detected metabolites, transcriptomics results indicate perturbation of enzymes Ptgis, and Ptgs2 (Cox-2) among others supporting an increase in the production of some of these mediators (Carvalho et al., 2022).

4. Conclusions

This is to our knowledge the first study assessing metabolomic changes in astrocytes isolated from 3xTg-AD mouse model. Our findings suggest important alterations in key energetic and signaling hubs of the brain like glutamate, GABA and TCA intermediaries. These findings reinforce the concept that neurotoxic astrocytes might have a compromised neuronal support capacity and/or directly have deleterious effect through aberrant neurotransmitter release. In addition we observe evidenced an increase of pro-inflammatory mediators related to the arachidonic acid metabolism. In a broader sense our findings suggest that the previous alterations occur as part of a stress response triggered at the endoplasmic reticulum (Figure 7). This response may not necessarily be deleterious at its early stages but constitute a survival or damage control mechanism of astrocytes as many of the annotated metabolites can have dual roles in the brain. Further research should be directed to confirm the existence of suggested alterations as well as detection of additional alterations in vivo and its role in disease progression. Above all our findings strengthen the value of astrocytes as therapeutic target for neurodegenerative diseases.

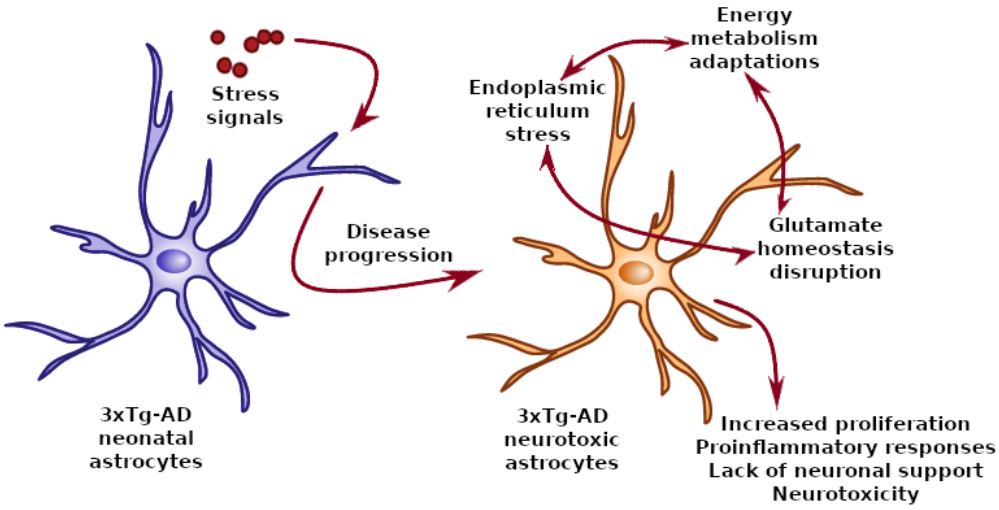


Fig. 7 Hypothetical mechanism underlying the phenotype of 3xTg-AD neurotoxic astrocytes

References

Acioglu, C., Li, L., & Elkabes, S. (2021). Contribution of astrocytes to neuropathology of neurodegenerative diseases. *Brain Research*, *1758*, 147291. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2021.147291

Amtul, Z., Uhrig, M., Wang, L., Rozmahel, R. F., & Beyreuther, K. (2012). Detrimental effects of arachidonic acid and its metabolites in cellular and mouse models of Alzheimer's disease: structural insight. *Neurobiology of Aging*, *33*(4), 831.e21-831.e31. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2011.07.014

An, H., Heo, J. Y., & Nam, C. J. L. and M.-H. (2021). The Pathological Role of Astrocytic MAOB in Parkinsonism Revealed by Genetic Ablation and Over-expression of MAOB. *Experimental Neurobiology*, *30*(2), 113–119. https://doi.org/10.5607/EN21007

Assefa, B. T., Gebre, A. K., & Altaye, B. M. (2018). Reactive Astrocytes as Drug Target in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/4160247

Behl, T., Kaur, D., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Zengin, G., Andronie-Cioara, F. L., Toma, M. M., Bungau, S., & Bumbu, A. G. (2021). Role of Monoamine Oxidase Activity in Alzheimer's Disease: An Insight into the Therapeutic Potential of Inhibitors. *Molecules 2021, Vol. 26, Page 3724*, *26*(12), 3724. https://doi.org/10.3390/MOLECULES26123724

Blennow, K., de Leon, M. J., Zetterberg, H., Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2006). Alzheimer's disease. *The Lancet*, *368*(9533), 387–403. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7

Blondel, V. D., Guillaume, J. L., Lambiotte, R., & Lefebvre, E. (2008). Fast unfolding of communities in large networks. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, *2008*(10), P10008. https://doi.org/10.1088/1742-5468/2008/10/P10008

Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2010). The pentose-phosphate pathway in neuronal survival against nitrosative stress. *IUBMB Life*, *62*(1), 14–18. https://doi.org/10.1002/IUB.280

Carvalho, D., Diaz-Amarilla, P., Dapueto, R., Santi, M. D., Duarte, P., Savio, E., Engler, H., Abin-Carriquiry, J. A., & Arredondo, F. (2022). *Transcriptomic analyses of neurotoxic astrocytes derived from adult triple transgenic Alzheimer's disease mice*.

Cassina, P., Peluffo, H., Pehar, M., Martinez-Palma, L., Ressia, A., Beckman, J. S., Estévez, A. G., & Barbeito, L. (2002). Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *Journal of Neuroscience Research*, *67*(1), 21–29. https://doi.org/10.1002/jnr.10107

Chinchore, Y., Begaj, T., Wu, D., Drokhlyansky, E., & Cepko, C. L. (2017). Glycolytic reliance promotes anabolism in photoreceptors. *ELife*, *6*. https://doi.org/10.7554/ELIFE.25946

Cho, E. S., Cha, Y. H., Kim, H. S., Kim, N. H., & Yook, J. I. (2018). The pentose phosphate pathway as a potential target for cancer therapy. In *Biomolecules and Therapeutics* (Vol. 26, Issue 1, pp. 29–38). Korean Society of Applied Pharmacology. https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.179

Chun, Heejung, An, H., Lim, J., Woo, J., Lee, J., Ryu, H., Lee, C. J., H, C., H, A., J, L. L., J, W., J, L. L., H, R., CJ, L., Chun, H., An, H., Lim, J., Woo, J., Lee, J., … CJ, L. (2018). Astrocytic proBDNF and Tonic GABA Distinguish Active versus Reactive Astrocytes in Hippocampus. *Experimental Neurobiology*, *27*(3), 155. https://doi.org/10.5607/EN.2018.27.3.155

Chun, Hyonho, & Keleş, S. (2010). Sparse partial least squares regression for simultaneous dimension reduction and variable selection. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Statistical Methodology*, *72*(1), 3–25.

https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2009.00723.x

Davis, I., & Liu, A. (2015). What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapeutics? *Http://Dx.Doi.Org/10.1586/14737175.2015.1049999*, *15*(7), 719–721. https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1049999

Derous, D., Mitchell, S. E., Green, C. L., Wang, Y., Han, J. D. J., Chen, L., Promislow, D. E. L., Lusseau, D., Douglas, A., & Speakman, J. R. (2018). The Effects of Graded Levels of Calorie Restriction: X. Transcriptomic Responses of Epididymal Adipose Tissue. *The Journals of Gerontology: Series A*, *73*(3), 279–288. https://doi.org/10.1093/GERONA/GLX101

Diaz-Amarilla, P., Arredondo, F., Dapueto, R., Boix, V., Carvalho, D., Santi, M. D., Vasilskis, E., Mesquita-Ribeiro, R., Dajas-Bailador, F., Abin-Carriquiry, J. A., Engler, H., & Savio, E. (2022). Isolation and characterization of neurotoxic astrocytes derived from old triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Neurochemistry International*, *159*. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105403

Díaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trias, E., Cragnolini, A., Martínez-Palma, L., Cassina, P., Beckman, J., & Barbeito, L. (2011). Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(44), 18126–18131. https://doi.org/10.1073/pnas.1110689108

Frediani, J. K., Jones, D. P., Tukvadze, N., Uppal, K., Sanikidze, E., Kipiani, M., Tran, V. T., Hebbar, G., Walker, D. I., Kempker, R. R., Kurani, S. S., Colas, R. A., Dalli, J., Tangpricha, V., Serhan, C. N., Blumberg, H. M., & Ziegler, T. R. (2014). Plasma metabolomics in human pulmonary tuberculosis disease: A pilot study. *PLoS ONE*, *9*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108854

Go, Y. M., Kim, C. W., Walker, D. I., Kang, D. W., Kumar, S., Orr, M., Uppal, K., Quyyumi, A. A., Jo, H., & Jones, D. P. (2015). Disturbed flow induces systemic changes in metabolites in mouse plasma: A metabolomics study using apoe-/- mice with partial carotid ligation. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *308*(1), R62–R72. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00278.2014

Gómez, L. A., Heath, S. H. D., & Hagen, T. M. (2012). Acetyl-l-carnitine supplementation reverses the age-related decline in carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) activity in interfibrillar mitochondria without changing the l-carnitine content in the rat heart. *Mechanisms of Ageing and Development*, *133*(2–3), 99–106. https://doi.org/10.1016/J.MAD.2012.01.007

Griffin, J. W. D., & Bradshaw, P. C. (2017). Amino Acid Catabolism in Alzheimer's Disease Brain: Friend or Foe? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 5472792. https://doi.org/10.1155/2017/5472792

Gulyás, B., Pavlova, E., Kása, P., Gulya, K., Bakota, L., Várszegi, S., Keller, É., Horváth, M. C., Nag, S., Hermecz, I., Magyar, K., & Halldin, C. (2011). Activated MAO-B in the brain of Alzheimer patients, demonstrated by [11C]-l-deprenyl using whole hemisphere autoradiography. *Neurochemistry International*, *58*(1), 60–68. https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2010.10.013

Gupte, S. A. (2010). Targeting the pentose phosphate pathway in syndrome X-related cardiovascular complications. *Drug Development Research*, *71*(3), 161–167. https://doi.org/10.1002/DDR.20359

Hajjar, I., Cai, Q., Yu, T., & Jones, D. P. (2020). Untargeted Metabolomics Shows Alterations in Homocysteine, Lipids and Fatty Acids predicting Memory Decline in Healthy Middle-Aged Individuals. *BioRxiv*, 2020.02.23.949537. https://doi.org/10.1101/2020.02.23.949537

Hajsl, M., Hlavackova, A., Broulikova, K., Sramek, M., Maly, M., Dyr, J. E., & Suttnar, J. (2020). Tryptophan Metabolism, Inflammation, and Oxidative Stress in Patients with Neurovascular Disease. *Metabolites 2020, Vol. 10, Page 208*, *10*(5), 208. https://doi.org/10.3390/METABO10050208

Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., … Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *The Lancet. Neurology*, *14*(4), 388. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5

Herrera, F., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Martín, V., Antolín, I., & Rodriguez, C. (2001). Glutamate induces oxidative stress not mediated by glutamate receptors or cystine transporters: protective effect of melatonin and other antioxidants. *Journal of Pineal Research*, *31*(4), 356–362. https://doi.org/10.1034/J.1600-079X.2001.310411.X

Hertz, L., Peng, L., & Dienel, G. A. (2007). Energy metabolism in astrocytes: High rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *27*(2), 219–249. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600343

Hertz, L., & Rothman, D. L. (2017). Glutamine-glutamate cycle flux is similar in cultured astrocytes and brain and both glutamate production and oxidation are mainly catalyzed by aspartate aminotransferase. In *Biology* (Vol. 6, Issue 1). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/biology6010017

Hochberg, Y., & Benjamini, Y. (1990). More powerful procedures for multiple significance testing. *Statistics in Medicine*, *9*(7), 811–818. https://doi.org/10.1002/sim.4780090710

Hoffman, J. M., Soltow, Q. A., Li, S., Sidik, A., Jones, D. P., & Promislow, D. E. L. (2014). Effects of age, sex, and genotype on high-sensitivity metabolomic profiles in the fruit fly, Drosophila melanogaster. *Aging Cell*, *13*(4), 596–604. https://doi.org/10.1111/ACEL.12215

Hotamisligil, G. S. (2010). Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*, *140*(6), 900–917. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.02.034

Houtkooper, R. H., Argmann, C., Houten, S. M., Cantó, C., Jeninga, E. H., Andreux, P. A., Thomas, C., Doenlen, R., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2011). The metabolic footprint of aging in mice. *Scientific Reports 2011 1:1*, *1*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/srep00134

Husted, A. S., Trauelsen, M., Rudenko, O., Hjorth, S. A., & Schwartz, T. W. (2017). GPCR-Mediated Signaling of Metabolites. *Cell Metabolism*, *25*(4), 777–796. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.03.008

Jo, S., Yarishkin, O., Hwang, Y. J., Chun, Y. E., Park, M., Woo, D. H., Bae, J. Y., Kim, T., Lee, J., Chun, H., Park, H. J., Lee, D. Y., Hong, J., Kim, H. Y., Oh, S.-J. J., Park, S. J., Lee, H., Yoon, B.-E. E., Kim, Y., … Lee, C. J. (2014). GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Medicine 2014 20:8*, *20*(8), 886–896. https://doi.org/10.1038/nm.3639

Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M., & Tanabe, M. (2021). KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D545–D551. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA970

Kim, K. Y., Hwang, S. K., Park, S. Y., Kim, M. J., Jun, D. Y., & Kim, Y. H. (2019). l-Serine protects mouse hippocampal neuronal HT22 cells against oxidative stress-mediated mitochondrial damage and apoptotic cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, *141*, 447–460. https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.07.018

Kohl, S. M., Klein, M. S., Hochrein, J., Oefner, P. J., Spang, R., & Gronwald, W. (2012). State-of-the art data normalization methods improve NMR-based metabolomic analysis. *Metabolomics*, *8*(S1), 146–160. https://doi.org/10.1007/s11306-011-0350-z

Li, S., Park, Y., Duraisingham, S., Strobel, F. H., Khan, N., Soltow, Q. A., Jones, D. P., & Pulendran, B. (2013). Predicting Network Activity from High Throughput Metabolomics. *PLoS Computational Biology*, *9*(7), 1003123. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003123

Li, S., Todor, A., & Luo, R. (2016). Blood transcriptomics and metabolomics for personalized medicine. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *14*, 1–7. https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2015.10.005

Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. In *Immunity* (Vol. 46, Issue 6, pp. 957–967). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006

Liu, K. H., Nellis, M., Uppal, K., Ma, C., Tran, V. L., Liang, Y., Walker, D. I., & Jones, D. P. (2020). Reference Standardization for Quantification and Harmonization of Large-Scale Metabolomics. *Analytical Chemistry*, *92*(13), 8836–8844. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00338

Liu, K. H., Walker, D. I., Uppal, K., Tran, V. L., Rohrbeck, P., Mallon, T. M., & Jones, D. P. (2016). High-resolution metabolomics assessment of military personnel Evaluating Analytical Strategies for Chemical Detection. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, *58*(8S), S53–S61. https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000773

Lodeiro, M., Ibáñez, C., Cifuentes, A., Simó, C., & Cedazo-Mínguez, Á. (2014). Decreased Cerebrospinal Fluid Levels of L-Carnitine in Non-Apolipoprotein E4 Carriers at Early Stages of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *41*(1), 223–232. https://doi.org/10.3233/JAD-132063

Magistretti, P. J. (2006). Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 209, Issue 12, pp. 2304–2311). The Company of Biologists Ltd. https://doi.org/10.1242/jeb.02208

Man, K., Kutyavin, V. I., & Chawla, A. (2017). Tissue Immunometabolism: Development, Physiology, and Pathobiology. *Cell Metabolism*, *25*(1), 11–26. https://doi.org/10.1016/J.CMET.2016.08.016

Manolescu, B. N., Berteanu, M., Oprea, E., Chiriac, N., Dumitru, L., Vlădoiu, S., Popa, O., & Ianăş, O. (2011). Dynamic of oxidative and nitrosative stress markers during the convalescent period of stroke patients undergoing rehabilitation: *Http://Dx.Doi.Org/10.1258/Acb.2011.010243*, *48*(4), 338–343. https://doi.org/10.1258/ACB.2011.010243

Martin-Jiménez, C. A., García-Vega, Á., Cabezas, R., Aliev, G., Echeverria, V., González, J., & Barreto, G. E. (2017). Astrocytes and endoplasmic reticulum stress: A bridge between obesity and neurodegenerative diseases. *Progress in Neurobiology*, *158*, 45–68. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2017.08.001

Medeiros, R., & LaFerla, F. M. (2013). Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Experimental Neurology*, *239*, 133–138. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.10.007

Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D., & Sedoris, K. (2012). c-Myc and Cancer Metabolism. *Clinical Cancer Research*, *18*(20), 5546–5553. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977

Noland, R. C., Koves, T. R., Seiler, S. E., Lum, H., Lust, R. M., Ilkayeva, O., Stevens, R. D., Hegardt, F. G., & Muoio, D. M. (2009). Carnitine Insufficiency Caused by Aging and Overnutrition Compromises Mitochondrial Performance and Metabolic Control *. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(34), 22840–22852. https://doi.org/10.1074/JBC.M109.032888

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kayed, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, *39*(3), 409–421. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3

Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P.-É., Li, S., & Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*, *1*. https://doi.org/10.1093/nar/gkab382

Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers.

Biochemical Pharmacology, *88*(4), 640–651. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024

Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, *43*(7), e47. https://doi.org/10.1093/nar/gkv007

Sambra, V., Echeverria, F., Valenzuela, A., Chouinard-Watkins, R., & Valenzuela, R. (2021). Docosahexaenoic and Arachidonic Acids as Neuroprotective Nutrients throughout the Life Cycle. *Nutrients 2021, Vol. 13, Page 986*, *13*(3), 986. https://doi.org/10.3390/NU13030986

Sapcariu, S. C., Kanashova, T., Weindl, D., Ghelfi, J., Dittmar, G., & Hiller, K. (2014). Simultaneous extraction of proteins and metabolites from cells in culture. *MethodsX*, *1*(1), 74–80. https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.07.002

Schaffer, S., & Kim, H. W. (2018). Effects and Mechanisms of Taurine as a Therapeutic Agent. *Biomolecules & Therapeutics*, *26*(3), 225–241. https://doi.org/10.4062/BIOMOLTHER.2017.251

Schubert, D., & Piasecki, D. (2001). Oxidative Glutamate Toxicity Can Be a Component of the Excitotoxicity Cascade. *Journal of Neuroscience*, *21*(19), 7455–7462. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-19-07455.2001

Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, *8*(6), 595–608. https://doi.org/10.15252/emmm.201606210

Shaw, C. E., Al-Chalabi, A., & Leigh, N. (2001). Progress in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Current Neurology and Neuroscience Reports 2001 1:1*, *1*(1), 69–76. https://doi.org/10.1007/S11910-001-0078-7

Sheng, X., Nenseth, H. Z., Qu, S., Kuzu, O. F., Frahnow, T., Simon, L., Greene, S., Zeng, Q., Fazli, L., Rennie, P. S., Mills, I. G., Danielsen, H., Theis, F., Patterson, J. B., Jin, Y., & Saatcioglu, F. (2019). IRE1α-XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling. *Nature Communications 2019 10:1*, *10*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41467-018-08152-3

Siracusa, R., Fusco, R., & Cuzzocrea, S. (2019). Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Frontiers in Pharmacology*, *0*(SEP), 1114. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.01114

Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends in Immunology*, *41*(9), 758–770. https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.07.004

Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7–35. https://doi.org/10.1007/S00401-009-0619-8/FIGURES/9

Soltow, Q. A., Strobel, F. H., Mansfield, K. G., Wachtman, L., Park, Y., & Jones, D. P. (2013). High-performance metabolic profiling with dual chromatography-Fourier-transform mass spectrometry (DC-FTMS) for study of the exposome. *Metabolomics*, *9*(SUPPL.1), 132–143. https://doi.org/10.1007/s11306-011-0332-1

Sprenkle, N. T., Sims, S. G., Sánchez, C. L., & Meares, G. P. (2017). Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular Neurodegeneration 2017 12:1*, *12*(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/S13024-017-0183-Y

Sun, L., Xu, Y.-W., Han, J., Liang, H., Wang, N., Cheng, Y., L, S., YW, X., J, H., H, L., N, W., & Y, C. (2015). *12/15-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid activate PPARγ: a possible neuroprotective effect in ischemic brain*. *56*(3), 502–514. https://doi.org/10.1194/JLR.M053058

Tefera, T. W., & Borges, K. (2018). Neuronal glucose metabolism is impaired while astrocytic TCA cycling is unaffected at symptomatic stages in the hSOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis:

Https://Doi.Org/10.1177/0271678X18764775, *39*(9), 1710–1724. https://doi.org/10.1177/0271678X18764775

Thomas, M. H., & Olivier, J. L. (2016). Arachidonic acid in Alzheimer's disease. *Journal of Neurology & Neuromedicine*, *1*(9), 1–6. www.jneurology.com

Trushina, E., Dutta, T., Persson, X. T., Mielke, M. M., & Petersen, R. C. (2013). *Identification of Altered Metabolic Pathways in Plasma and CSF in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Using Metabolomics*. *8*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063644

Uppal, K., Ma, C., Go, Y. M., & Jones, D. P. (2018). XMWAS: A data-driven integration and differential network analysis tool. *Bioinformatics*, *34*(4), 701–702. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx656

Uppal, K., Soltow, Q. A., Strobel, F. H., Pittard, W. S., Gernert, K. M., Yu, T., & Jones, D. P. (2013). XMSanalyzer: Automated pipeline for improved feature detection and downstream analysis of large-scale, non-targeted metabolomics data. *BMC Bioinformatics*, *14*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-15

Uppal, K., Walker, D. I., & Jones, D. P. (2017). xMSannotator: An R package for network-based annotation of high-resolution metabolomics data. *Analytical Chemistry*, *89*(2), 1063–1067. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01214

Valvona, C. J., Fillmore, H. L., Nunn, P. B., & Pilkington, G. J. (2016). The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *26*(1), 3–17. https://doi.org/10.1111/BPA.12299

van Gijsel-Bonnello, M., Baranger, K., Benech, P., Rivera, S., Khrestchatisky, M., de Reggi, M., & Gharib, B. (2017). Metabolic changes and inflammation in cultured astrocytes from the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease: Alleviation by pantethine. *PloS One*, *12*(4), e0175369. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175369

Waagepetersen, H. S., Sonnewald, U., & Schousboe, A. (2009). Energy and Amino Acid Neurotransmitter Metabolism in Astrocytes. *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System*, *9780387794921*, 177–200. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79492-1_7

Wang, Z. H., Peng, W. B., Zhang, P., Yang, X. P., & Zhou, Q. (2021). Lactate in the tumour microenvironment: From immune modulation to therapy. *EBioMedicine*, *73*. https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2021.103627

Wang, Z. J., Liang, C. L., Li, G. M., Yu, C. Y., Yin, M., ZJ, W., CL, L., GM, L., CY, Y., & M, Y. (2006). *Neuroprotective effects of arachidonic acid against oxidative stress on rat hippocampal slices*. *163*(3), 207–217. https://doi.org/10.1016/J.CBI.2006.08.005

Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorndahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., … Scalbert, A. (2013). HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1). https://doi.org/10.1093/nar/gks1065

Yadav, R. K., Chae, S.-W., Kim, H.-R., Chae, and H. J., Chae, H. J., & Chae, and H. J. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, *19*(2), 75–88. https://doi.org/10.15430/JCP.2014.19.2.75

Yu, T., Park, Y., Johnson, J. M., & Jones, D. P. (2009). apLCMS-adaptive processing of high-resolution LC/MS data. *Bioinformatics*, *25*(15), 1930–1936. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp291

Zhang, T., Li, N., Sun, C., Jin, Y., & Sheng, X. (2020). MYC and the unfolded protein response in cancer: synthetic lethal partners in crime? *EMBO Molecular Medicine*, *12*(5). https://doi.org/10.15252/EMMM.201911845

Zlokovic, B. V. (2005). Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends in Neurosciences*, *28*(4), 202–208. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2005.02.001

1.2.1. Material suplementario 1 manuscrito metabolómica

Para acceder al material suplementario 1 siga este **vínculo**.

1.2.2. Material suplementario 2 manuscrito metabolómica

Para acceder al material suplementario 2 siga este **vínculo**.

1.3. Manuscrito neuroprotección por flavanonas preniladas "*Prenylated flavanone isolated from Dalea species as a potential multitarget-neuroprotector in an in vitro Alzheimer's disease mice model*", Santi et al. 2023

Prenylated flavanone isolated from *Dalea* species as a potential multitarget-neuroprotector in an *in vitro* Alzheimer's disease mice model

Maria D. Santi[1,2*], Diego Carvalho[3*], Rosina Dapueto[2], Manuela Bentura[2], Maia Zeni[2,4], Laura Martínez-González[5,6], Ana Martínez[5,6], Marian A. Peralta M.[1,7], Ana Rey[4], Javier Giglio[2,4], Maria G. Ortega[1,7], Eduardo Savio[2], Juan A. Abin-Carriquiry[8], Florencia Arredondo[2, 3 #]

[1] *Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET), Ciudad Universitaria. X5000HUA Córdoba, Argentina*

[2] *R&D Biomédico y Química Farmacéutica, Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM)*

[3] *Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, 11600 Montevideo, Uruguay*

[4] *Área de Radioquímica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay*

[5] *Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, CSIC, Calle Ramiro Maétzu 9, 28040 Madrid, Spain*

[6] *Centro de Investigación Biomédica en Red Sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, 28031 Madrid, Spain*

[7] *Farmacognosia, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Haya de la torre y Medina Allende, Edificio Ciencias II, X5000HUA Córdoba, Argentina*

[8] *Laboratorio de Biofármacos, Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay*

[#]Corresponding author:

E-mail address: florencia.arredondo@cudim.org

[*]M.D.S and D.C. contributed equally to this work.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) involves a neurodegenerative process that has not yet been prevented, reversed, or stopped. Continuing with the search of natural pharmacological treatments, flavonoids are a family of compounds with proven neuroprotective effects and multi-targeting behavior. The American genus *Dalea* L. (Fabaceae) is an important source of bioactive flavonoids. In this opportunity, we tested the neuroprotective potential of three prenylated flavanones isolated from *Dalea* species in a new *in vitro* pre-clinical AD model previously developed by us. Our approach consisted in exposing neural cells to conditioned media (*3xTg-AD ACM*) from neurotoxic astrocytes derived from hippocampi and cortices of old 3xTg-AD mice, mimicking a local neurodegenerative microenvironment. Flavanone **1** and **3** showed a neuroprotective effect against *3xTg-AD ACM*, being **1** more active than **3**. The structural requirements to afford neuroprotective activity in this model are a 5'-dimethylallyl and 4'-hydroxy at the B ring. In order to search the mechanistic performance of the most active flavanone, we focus on the flavonoid-mediated regulation of GSK-3β-mediated tau phosphorylation previously reported. Flavanone **1** treatment decreased the rise on hyperphosphorylated tau protein neuronal levels induced after *3xTg-AD ACM* exposure and inhibited the activity of GSK-3β. Finally, direct exposure of flavanone **1** to these neurotoxic 3xTg-AD astrocytes resulted toxic on these cells and decreased the neurotoxicity of *3xTg-AD ACM* as well. Our results allow us to present compound **1** as a natural prenylated flavanone that could be used as a precursor to development and design of future drug therapies for AD.

Keywords Prenylated flavanones, Alzheimer's disease, dementia, 3xTg-AD mouse, Tau & phospho-Tau protein, glycogen synthase kinase 3β

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia, contributing to around 60-70 % of the cases. The prevalence of this pathology increases considerably with age, affecting around 5-10 % of the population over 65 years of age, and it is expected to increase to around 47 to 131 million people affected by the year 2050 (Prince et al. 2015; Lynch and Alzheimer's Disease International. 2019; Alzheimer's Disease International. 2020, 2022). Likewise, AD is one of the diseases with the highest social and economic costs worldwide, which in 2015 was estimated to be around 818 billion US dollars (Prince et al. 2015; Lynch and Alzheimer's Disease International. 2019; Alzheimer's Disease International. 2020, 2022).

AD is characterized by memory impairment and temporal-spatial disorientation leading to intellectual and personal deterioration. These symptoms are associated with the accumulation of amyloid-β (Aβ) peptide in the form of senile plaques and aggregates of hyperphosphorylated tau protein (microtubule-associated protein-τ, MAP-τ) in neurofibrillary tangles (NFTs) (Reitz and Mayeux 2014; Alzheimer's Association 2019). Furthermore, AD brain tissue exhibits synaptic impairment, neuronal loss, as well as chronic neuroinflammation and astrocyte reactivity. In this sense, evidence suggests that the loss of homeostatic astrocytic functions and/or their gain of toxic effects could be involved in the progression of AD and many other pathologies of the nervous system (Heneka et al. 2015; Acosta et al. 2017; Clarke et al. 2018; Hole and Williams 2020).

Current pharmacological treatments approved by the Food and Drug administration (FDA) lead to some symptomatic improvement, but do not stop or delay the underlying neurodegenerative process (Ritchie et al. 2004; Bullock 2006). Multiple strategies aimed at reducing Aβ accumulation, such as passive immunization, have been evaluated showing some marker improvement, but efficacy and safety are still lacking (Yiannopoulou and Papageorgiou 2020; Cummings et al. 2021; Mahase 2021b, a; van Dyck et al. 2022). Owing to that, there is a growing interest to develop pharmacological strategies to treat the AD progression targeting the regulation of tau phosphorylation and misfolding, as the occurrence of NFTs and related markers better correlates with neuronal loss and clinical symptoms in AD (Ossenkoppele et al. 2016; Thal and Vandenberghe 2016; Hole and Williams 2020; Visser et al. 2022).

Tau protein has important roles associated with cytoskeletal stabilization and organization which impact axon function and development in neurons (Hirokawa et al. 1996; Barbier et al. 2019). In pathological conditions such as AD, tau is hyperphosphorylated by several protein kinases including MAP kinases, CDK5 and glycogen synthase kinase 3β (GSK-3β). Hyperphosphorylated tau misfolds, aggregates into oligomers, and is proposed to be involved in the subsequent synaptic loss and neuronal death characteristic of AD (Noble et al. 2003; Strang et al. 2019).

Natural compounds are a promising source of bioactive molecules with protective properties against many of the pathological process involved in neurodegenerative diseases. In particular, flavonoids have

shown neuroprotective properties and multi-target activities including regulation of tau phosphorylation and aggregation (Echeverry et al. 2010; Arredondo et al. 2010; Hole and Williams 2020; Santi et al. 2020; Williams et al. 2021). In this context, we have previously reported the isolation, identification, and neuroprotective effects against oxidative stress-induced death of five prenylated flavonoids obtained from South American *Dalea* species in two *in vitro* models of neurodegeneration (Peralta et al. 2014; Santi et al. 2017).

Considering the promising activities found for some of these compounds, in the present work we informed for the first time the neuroprotective effect of three natural prenylated flavanones: *(-)-(2S)-2',4'-dihydroxy-5'-(1''',1'''-dimethylallyl)-8-prenylpinocembrin* (8PP, **1**), *(-)-(2S)-8-prenylpinocembrin* (Glabranin, **2**), *(-)-(2S)-4'-hydroxy-2'-methoxy-5'-(1''',1'''-dimethylallyl)-8-prenylpinocembrin* (Me8PP, **3**). Compounds **1** and **2** were isolated from roots and aerial parts of *D. elegans*, while compound **3** was obtained from roots of *D. pazensis*, and their neuroprotective profile was evaluated in our *in vitro* degenerative model recently described (Diaz-Amarilla et al. 2022). This model involves a paradigm that includes the exposure of primary neuronal cultures isolated from hippocampus and cortex of embryos (E16-18) of C57B6J mouse (CxH_C57) to the neurotoxic conditioned medium of “old” astrocytic cultures derived from 9-10 months-old 3xTg-AD mice (*3xTg-AD astrocyte conditioned media*, *ACM*). Furthermore, in order to establish structure-activity relationships (SARs), we have also evaluated the effects of the commercial flavanone, pinocembrin (P, **4**).

Compound **1** showed the most potent neuroprotective activity in our *in vitro* AD model. Regarding its mechanistic performance, compound **1** was tested *in vitro* for its influence on the levels of the hyperphosphorylated tau protein. Additionally, whether compound **1** can target the key tau kinase GSK-3β was further investigated by *in silico* and *in vitro* studies. Finally, as an approach to assess the compound's potential to prevent neurodegeneration, we evaluated the ability of compound **1** to reduce the viability of 3xTg-AD astrocytic culture and/or the neurotoxicity of its conditioned media.

Results and discussion

Flavanones toxicity *per se* and protective effects against 3xTg-AD ACM-mediated neurotoxicity

According to our previous report, *3xTg-AD ACM* is neurotoxic when added to primary neuronal cultures, causing neuronal GSK-3β activation, cytochrome c pattern changes, and an increase in caspase 3 activity, suggesting the activation of the intrinsic apoptotic pathway (Fig. 1) (Diaz-Amarilla et al. 2022). Interestingly, all those observed events are involved in the AD degeneration (Stutzmann 2007; Hooper et al. 2008; Jope et al. 2011).

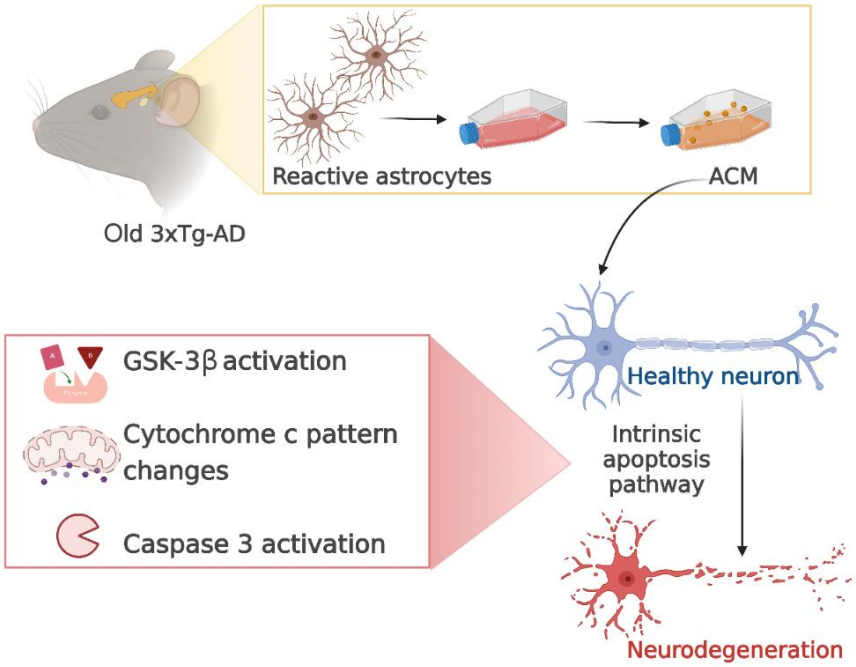


Fig. 1 Activated pathways on neurons treated with *3xTg-AD ACM.* Authors' own figure created with *BioRender.com*

In this work, we evaluated the neuroprotective effects of flavanones (**1**-**4**) (Fig. 2) against *3xTg-AD ACM* induced-injury, and their neuronal toxicity *per se*.

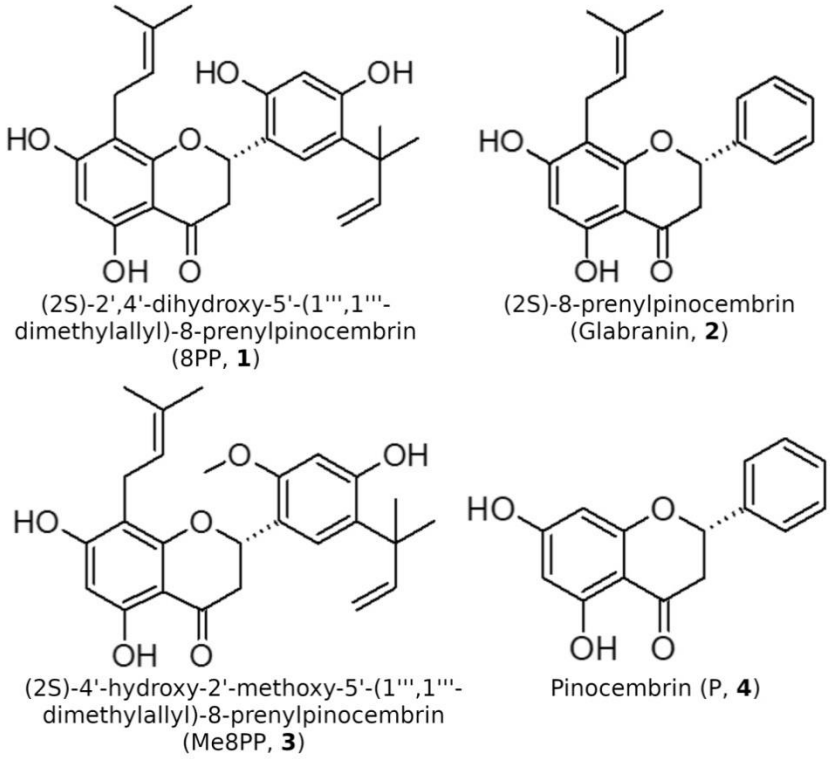


Fig. 2 Flavanones isolated from roots and aerial parts of *Dalea* species (**1**-**3**) and commercial flavanone pinocembrin (**4**)

Following the *in vitro* AD paradigm, neuronal cultures were pre-treated with each natural compound for 5 h, and then exposed to *3xTg-AD ACM* for 24 h. Fig. 3 depicts the neuroprotective profiles of compounds **1**-**4** and the results are further summarized in Table 1. Only compounds **1** and **3** were found to be active. In particular, compound **1** was the most potent neuroprotector and showed marked biphasic behavior in attenuating neuronal death at a nanomolar concentration (EC = 10 nm). Although compound **3** was less potent, it also showed a significant neuroprotective activity. Meanwhile, compounds **2** and **4** were inactive.

Additionally, we assessed the toxicity *per se* of compounds **1**-**4** after 24 h treatment of the primary neuronal cultures (Table 1). Compound 1 was toxic at concentrations up to 2.2 µM, but not at its effective concentration. On the other hand, compound **2** showed an LC50 value of 25.1 µM, and compounds **3** and **4** did not present toxicity *per se* at the evaluated concentrations.

Table 1 Neuroprotection of compounds **1**-**4** represented by maximum percentage of neuronal survival after ACM treatment on neuronal cultures, associated EC (effective concentration) and LC_{50} (median lethal concentration)

Flavanone	Neuroprotection		Toxicity
	Neuronal survival (% control)	EC (μM)	LC50 (μM)
1	100	0.01	(2.2 ± 0.3)
2	—	—	(25.1 ± 0.6)
3	89	25	> 100
4	—	—	> 25

Conducting structure-activity relationships, our results indicated that, the necessary substituents to present protective activity are: 5'-dimethylallyl and 4'-hydroxy at the B-ring. Moreover, if we compare the percentage of protective activity of all compounds, compound **1** showed to be the more efficient and potent as a neuroprotector. According to that, a 2'-hydroxy substituent at B-ring is responsible for the difference observed in the activity. This fact is reinforced if we consider that the less active compound (compound **2**), and the inactive compound (compound **4**) do not have substituents at B-ring.

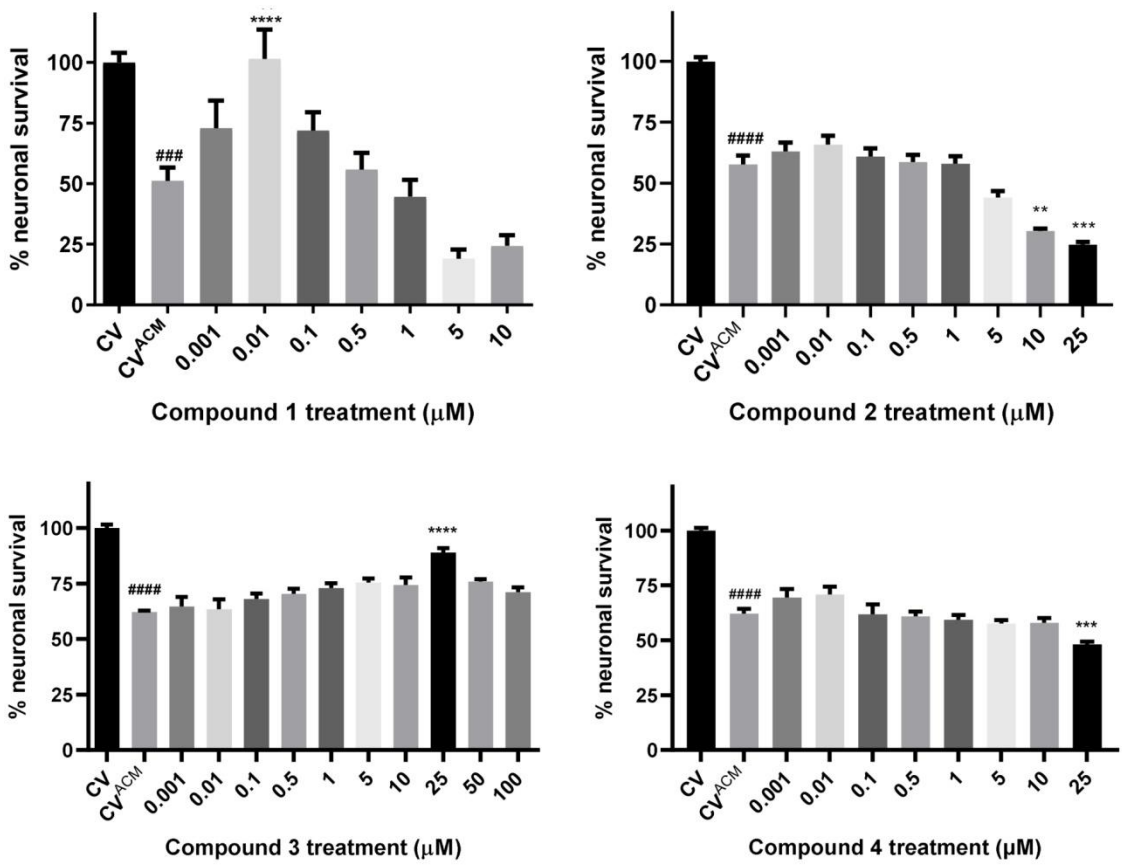


Fig. 3 Neuronal survival of CxH_C57 cells treated with different prenylated flavanones, before 3*xTg-AD ACM* -death. # Statistically different with respect to control vehicle (CV). * Statistically different with respect to control after injury with *3xTg-AD ACM* (CV^{ACM})

Compound 1 *in silico* studies on GSK-3β

We have previously reported a list of putative AD-related targets obtained through *in silico* studies, in which GSK-3β emerged as a potential target for compound **1** (Santi et al. 2020). An exacerbated activity of this enzyme is involved on different events related to the AD pathogenesis (Hooper et al. 2008). For instance, GSK-3β overactivity results in hyperphosphorylation of tau in most serine and threonine residues, and causes its accumulation as intraneuronal tangles of paired helical filaments, leading to the Tau pathology associated with AD (Hernandez et al. 2013). As we previously informed, treatments with *3xTg-AD ACM* caused neuronal modifications in GSK-3β phosphorylation state, resulting in enzyme activation (Diaz-Amarilla et al. 2022).

Binding of **1** on GSK-3β was further evaluated *in silico* by molecular docking. Crystal structure of the corresponding mouse protein in a complex with flavonoid morin (6ae3) was taken as the main reference for comparison. To date, this is the only structure deposited in the PDB of a GSK-3β-flavonoid complex. Additional human crystal structures were used to account for binding site flexibility and confirm homology

to the mouse protein. Superposition of these crystal structures shows equivalent binding sites (see Supplementary material). Blind docking confirmed interaction with the ATP binding site, from which docking was further optimized. Top ranking poses of compound **1** on mouse crystal structure 6ae3 show a similar orientation than morin, consistent with their structural similarity (Fig. 4).

Flavonoids have a common 15C skeleton, encompassing a phenyl ring (A) next to a heterocyclic ring (C-ring) which is joined by another phenyl ring (B-ring) that has free rotation. Even though, compound **1** presents a number of important differences, including lack of planarity of the C-ring, absent OH group at position 3 of the C-ring, and prenylation at positions 5' of the B-ring, and 8 of the A-ring. Flavonoid OH groups appear to be the main anchor points to the protein. These contacts could be split in two regions, one accessible for 7-OH and the other for 4-O with contributions of 5-OH and 2'-OH. The first region includes residues Asp 133, and Val 135, while the second region constitutes a polar pocket of residues Asp 200, Lys 85, Gln 185, Asn 186, Asn 64 and Cys 199. Hydrogen bond interactions with side chains and/or backbone of these residues show flexibility as it can be observed throughout the multiple crystal structures docked (see Supplementary material). Even though, contacts with Asp 200, Val 135 and Asp 133 appear to be the most frequent. These contacts are also observed for other known inhibitors. Similarly, to morin a water bridge at the second region can be observed.

Flavanone **1** has one prenylated group, and one dimethylallyl group that GSK-3β can properly accommodate on an opposite more hydrophobic region including residues Leu 188, Val 110, Thr 138, Ala 83, Ile 62, Tyr 134, Val 135, Val 70, Phe 67, Tyr 140. Reported GSK-3β inhibitors in the PDB are generally polar molecules with multiple ring systems. In this sense prenylated compounds like flavanone **1** are a novelty that could generate a new array of inhibitors (Fig. 5). Additionally, many flavonoid compounds have the ability to form quinones that might react with sulfur groups and this feature could be associated to their neuroprotective effects (Boots et al. 2003; Martínez-Busi et al. 2019). Whether there could be a covalent interaction of similar molecules with residue Cys 200 at the binding site is an interesting consideration.

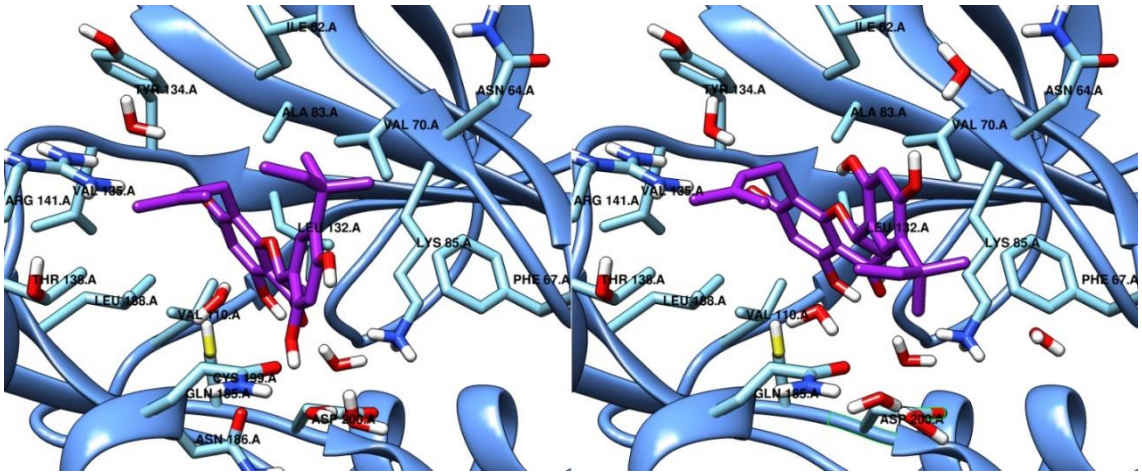


Fig. 4 Binding modes of the prenylated flavanone **1** on mouse GSK-3β. PDB crystal structure 6ae3. See supplementary material for similar results on human crystal structures. Image rendered in *UCFS* chimera software (Pettersen et al. 2004). Rotation of the B-ring can originate an alternative pose (left side), even though the preferred orientation of the B-ring appears to be the same as in morin

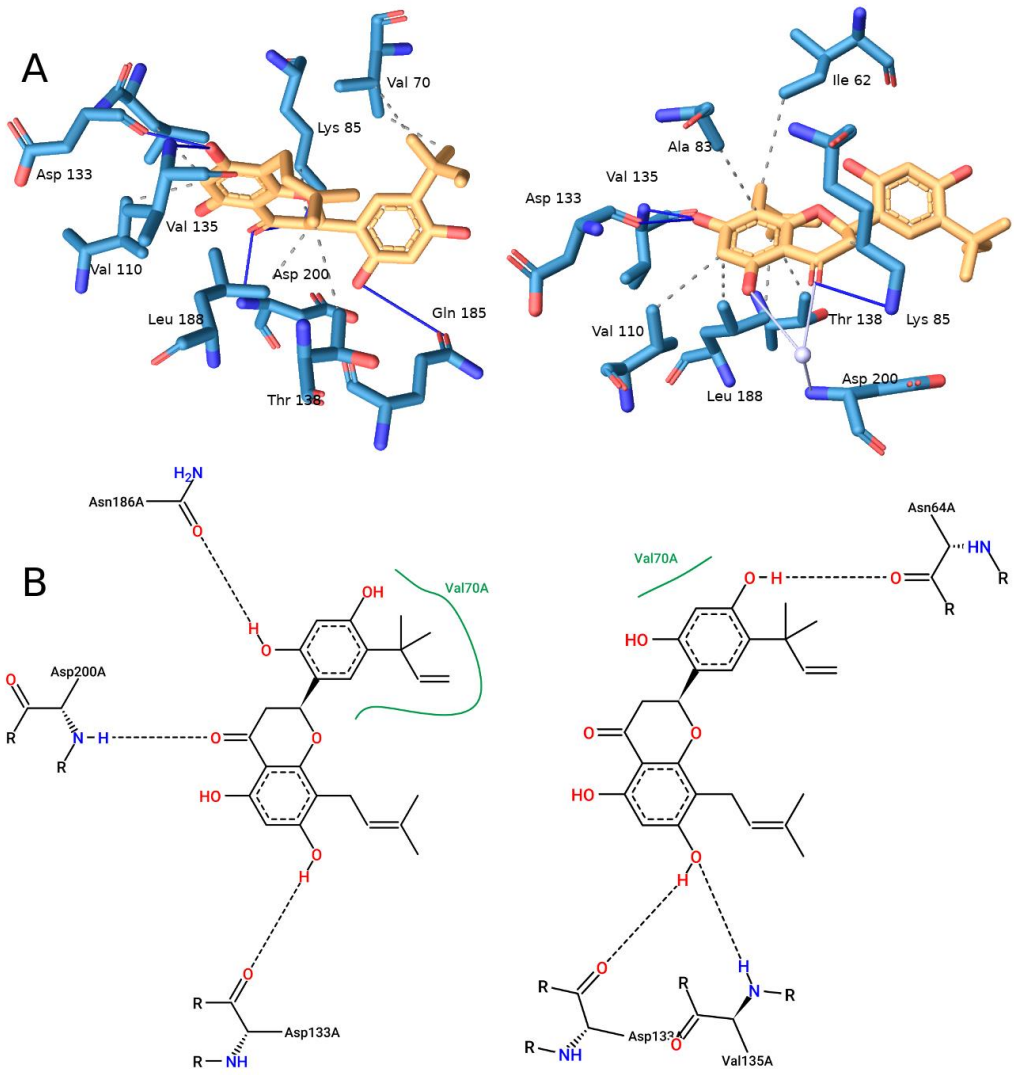


Fig. 5 Molecular contact information of compound **1** on mouse GSK-3β. PDB crystal structure 6ae3. See supplementary material for similar results on human crystal structures. Image A adapted from *PLIP* (Salentin et al. 2015) web server and image B from *ProteinsPlus* (Fährrolfes et al. 2017) web server

Additionally, molecular dynamics simulations were performed for compound **1** and reference compound **2** and **4** to estimate their binding free energy (affinity) to the complexes. The interaction energy of compound **1** obtained was the best of the assayed flavanones and fell in the same order of magnitude as most of the co-crystallized inhibitors supporting the interaction with GSK-3β enzyme (Table 2).

Table 2 Binding free energy of selected flavanone- GSK-3β complexes (kcal/mol) calculated with the MM/PBSA method (Kollman et al. 2000; Liu and Hou 2016)

PDB	Co-crystallized ligands	Compound 1 (8PP)		Compound 2 (glabranin)		Compound 4 (pinocembrin)	
		Pose a	Pose b	Pose a	Pose b	Pose a	Pose b
1i09	—	-20.1	-21.8	-16.3	-16.0	-16.6	-12.5
1q3w	-23.7	-12.3	-19.1	-23.2	-15.1	-12.9	-17.2
1q41	-22.1	-19.9	-20.4	-15.9	-22.2	-9.8	-10.8
3q3b	-0.6	-21.9	-22.5	-15.3	-11.6	-11.5	-13.6
6ae3	-10.2	-21.3	-13.2	-18.9	-16.4	-6.2	-7.3
Average	-14.2	-19.3		-17.1		-11.8	
Median	-16.2	-20.3		-16.2		-12.0	

Altogether, our results suggest that compound **1** could exert its neuroprotective effects in part through modulation of GSK-3β activity, and thus it could prevent Tau pathology associated events ocurring in AD.

In vitro inhibitory activity of GSK-3β-dependent Tau phosphorylation by compound 1

In order to explore the potential of compound **1** to inhibit GSK-3β-dependent tau phosphorylation, we evaluated its influence on the levels of phosphorylated tau on CxH_C57 neurons injured with *3xTg-AD ACM* for 1.5 h, time in which we previously observed the GSK-3β phosphorylation state change (Diaz-Amarilla et al. 2022). Fig. 6A shows that compound **1** decreased (15 ± 3) % the level of phosphorylated tau [pS199], at a concentration of 0.1 µM, compared with the control without compound **1** pre-treatment. It should be noted that lower and higher concentrations did not significantly decrease the % of tau

phosphorylated. Furthermore, we validated the *in vitro* GSK-3β inhibitory activity of compound **1**. In Fig. 6B it could be seen that compound **1** inhibits GSK-3β in a concentration-dependent manner with an IC_{50} value of (43 ± 15) µM.

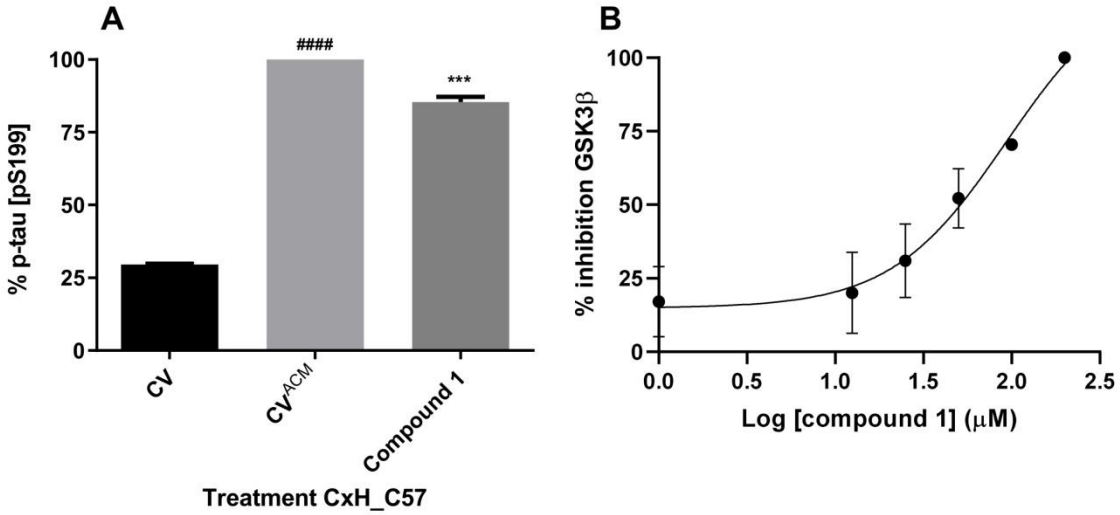


Fig. 6 % phosphorylated tau [pS199] on CxH_C57 neurons. CV: control vehicle. CVMC: control of CxH_C57 neurons injured with *3xTg-AD ACM* for 1.5 h. Compound **1**: CxH_C57 neurons pre-treated during 5 h with the natural compound at a concentration of 0.1 µM, and then injured with *3xTg-AD ACM* for 1.5 h. #Statistically different with respect to control vehicle (CV). *Statistically different with respect to control after injury with *3xTg-AD ACM* **(A)**. *In vitro* GSK-3β inhibitory activity by compound **1 (B)**

Our results suggest that the cellular and molecular mechanisms underlying compound **1** neuroprotection may involve the modulation of GSK-3β activity, as evidenced by the *in silico* and *in vitro* analysis as well as by the evaluation of inhibition of tau phosphorylation.

In addition, we have previously reported that compound **1** also inhibits human acetylcholinesterase (Santi et al. 2020). Thus, all those pharmacological activities together could explain the potency and efficacy observed for compound **1** as a neuroprotective multi-target molecule for AD treatment.

Compound 1 effect on astrocytic cultures derived from old symptomatic 3xTg-AD mouse

It has been reported that reactive astrocytes are strongly present in central nervous system (CNS) chronic diseases as AD. As well, evidence suggests that astrocytes have an important role in the pathological processes involved in neurodegenerative diseases. In these contexts, reactive astrocytes can lose most normal functions such as their trophic and brain-protective roles, but gain neurotoxic functions, affecting neurons and mature differentiated oligodendrocytes (Olabarria et al. 2010; Kulijewicz-Nawrot et al. 2012; Heneka et al. 2015; Iram et al. 2016; Liddelow et al. 2017; Diaz-Amarilla et al. 2022).

Likewise, the reversion of these altered astrocytic phenotypes could prevent their neurotoxic action, and thus stop or attenuate neurodegeneration in AD.

With these precedents in mind, compound **1** was tested directly on neurotoxic astrocytic cultures derived from symptomatic 3xTg-AD aged mice to assess its effect on cell culture viability. Results showed that compound **1** treatment is toxic for these cells, with an LC_{50} value of (4.0 ± 0.5) μM (Fig. 7), suggesting its potential to block or reverse the neurodegeneration exerted by these cells.

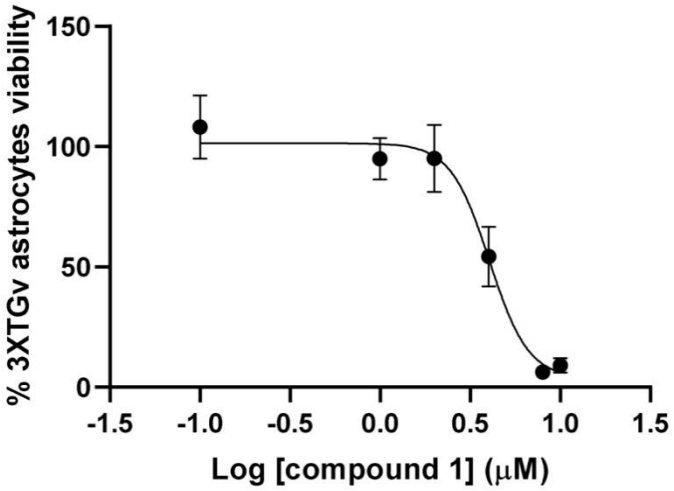


Fig. 7 % Viability of astrocytes isolated from old 3xTg-AD mouse (strain: B6;129-Psen1^{tm1Mpm} Tg(APPSwe,tauP301L)1Lfa/Mmjax) pre-treated 24 h with compound **1**

Compound 1 effects on 3xTg-AD ACM-mediated neurotoxicity

We aimed to explore flavanone **1** effect on neurotoxic 3xTg-AD astrocytic cultures, as an alternative mechanism to prevent neurodegeneration in our model. Hence, we evaluated its potential to reduce or reverse the *3xTg-AD ACM* toxicity on CxH_C57 neurons. Fig. 8 shows that 3xTg-AD *ACM* neurotoxicity decreases (19 ± 6) % when 3xTg-AD astrocytic cultures were previously treated with compound **1** at a concentration of 1 μM for 24 h.

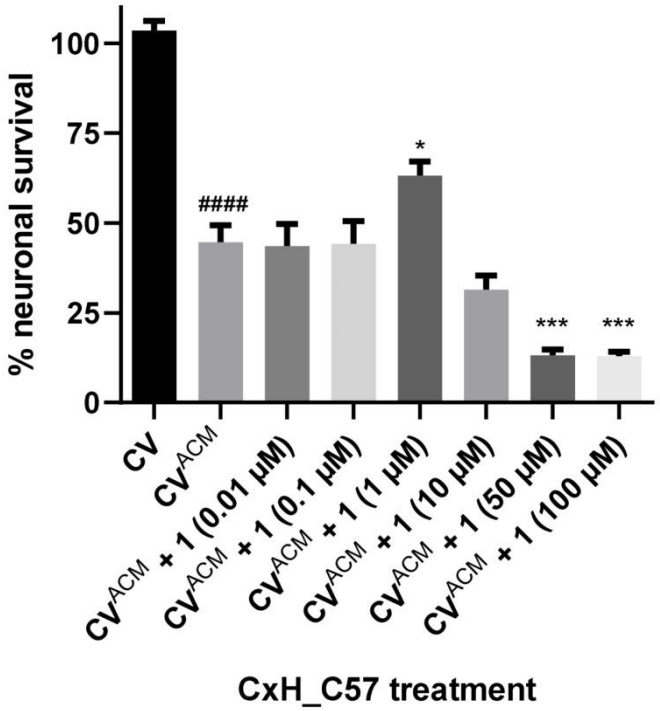


Fig. 8 Neuronal survival of CxH_C57 cells treated with different *3xTg-AD ACM*. ACM + 1: CxH_C57 cells treated with *3xTg-AD ACM* pre-treated during 24 h with compound **1** at different concentrations. # Statistically different with respect to control vehicle (CV). * Statistically different with respect to control after injury with *3xTg-AD ACM* without astrocytes treatment with compound **1** (CV^{ACM})

Our previous reports showed that ACM from 3xTg-AD can cause neuronal degeneration both locally in the soma and dendrites, and distally in the axons when the somato-dendritic surface is exposed to the *ACM* (Diaz-Amarilla et al. 2022). Although, the identity or composition of the neurotoxins present in the conditioned media is still unknown, the effect of compound **1** in reducing the toxicity of the *3xTg-AD ACM* suggests an interesting approach to identify new therapeutic alternatives for neurodegenerative processes. We also have reported that Aβ generation blocked by tert-Butyl (S)-{(2S)-2-[2-(3,5-difluorophenyl) acetamido] propenamide} phenylacetate (DAPT) did not prevent old 3xTg-AD ACM neurotoxic effects (Diaz-Amarilla et al. 2022). In that sense, the observed effects of compound **1** in this model would not involve the Aβ pathway. Overall, the present results suggest that compound **1** is toxic for old 3xTg-AD astrocytes as well as decreases their neurotoxicity. More studies will be necessary in order to explore the neuroprotective effects of compound **1** in an *in vivo* AD model, its bioavailability, and how its multi-target mechanisms of action could be used to treat the neurodegeneration observed in AD.

Conclusions

Prenylated flavanones of *Dalea elegans* Gillies ex. Hook. & Arn and *Dalea pazensis* Rusby have demonstrated to perform neuroprotective activities in two *in vitro* models of neurodegenerative diseases previously reported by us.

In the present work, we tested these compounds on a new pre-clinical *in vitro* model of Alzheimer's disease. This paradigm involves the exposure of primary neuronal cultures to the conditioned media of neurotoxic astrocytes derived from 3xTg-AD mice, resulting in neuronal death.

The obtained results showed that two natural compounds isolated from roots of *Dalea* species: *(-)-(2S)-5,7, 2',4'-tetrahydroxy-5'-(1''',1'''-dimethylallyl)-8-prenylflavanone* (8PP, **1**) and *(2S)-4'-hydroxy-2'-methoxy-5'-(1''',1'''-dimethylallyl)-8-prenylpinocembrin* (Me8PP, **3**) had neuroprotective effects in this novel paradigm. Moreover, we reported the structure-activity relationships for the four flavanones studied. Substitutions on 5'-dimethylallyl and 4'-hydroxy at the B ring were found as necessary requirements to show neuroprotective activities, while a 2'-hydroxy substituent at the B ring improved the activity. In the flavanone series studied, compound **1** was the most potent and efficient neuroprotector. Exploring its mechanism of action, we studied and informed the *in silico* binding modes of compound **1** on the tau phosphorylation key enzyme GSK-3β. Its arrangement in the active site resulted to be a novelty that could generate a new array of inhibitors. Furthermore, we determined not only that compound **1** decreases the levels of GSK-3β-dependent hyperphosphorylated tau protein on neuronal cultures exposed to *3xTg-AD ACM,* but also that the natural compound inhibits GSK-3β activity *in vitro*, which lays in agreement with our previous *in silico* results. Finally, we observed that after direct exposure on 3xTg-AD neurotoxic astrocytes, compound **1** presented toxicity on these cells, and decreased the neurotoxicity of *3xTg-AD ACM* as well.

In summary, prenylated flavanone **1** is a multi-target compound with a novel neuroprotective potential. The present results, along with our previous reports, led us to propose this natural compound as a leader and precursor for the development and design of future drug therapies focused on the tau pathology observed in AD.

Materials and methods

Plant material and processing

Aerial parts and roots of *Dalea elegans* Gillies ex Hook. & Arn. *var. elegans* (Fabaceae) were collected near Cabalango (Córdoba, Argentina, GPS coordinates: latitude: 31°24′04.62″ South; longitude: 64°34′19.21″ West; height: 763 m), in February 2012. The identification was performed by Prof. Dr. Gloria Barboza of the Botanical Museum, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina (CORD). A representative voucher specimen is on deposit as CORD Peralta 2. *Dalea pazensis* Rusby's (Fabaceae) roots were collected in Yotala, locality close to Sucre city (19°08′53″ S 65°15′48″ W at 2543 m above sea level), in March 2013. Plant material was identified by specialized personnel belonging at the Herbario del Sur de Bolivia (HSB) (Portal E. & López C.D.) and a voucher specimen is on deposit as 961A. The isolation, purification and identification of the flavanones was carried out as described in our previous publications (Peralta et al. 2014; Santi et al. 2017, 2020). Briefly, the flavanones were isolated and purified by benzene extraction on dried samples, along with column chromatography, silica gel, and preparative TLC purification. Structural determination was performed by 1D and 2D NMR spectroscopy as well as HRMS analysis.

Chemicals and animals

All chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless stated otherwise. All procedures using laboratory animals were performed in accordance with the international guidelines for the use of live animals and were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (CEUA-CUDIM) as established by the National Committee of Animal Experimentation (CNEA). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Mice homozygous 3xTg-AD (B6;129-Tg(APPSwe,tauP301L)1Lfa Psen1(tm1Mpm)/Mmjax strain) (Oddo et al. 2003) and wild-type non-transgenic (Non-Tg) (C57BL/6J strain) (The Jackson Laboratory) were bred and housed in CUDIM SPF centralized animal facility with a 12-h light-dark cycle with *ad libitum* access to food and water.

Primary neuronal cultures

Hippocampi and cortices were purified from embryos of C57BL/6J as previously reported (Diaz-Amarilla et al. 2022). Briefly, after embryos were decapitated, was performed an aseptic dissection of the hippocampi and cortices in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), carefully removing meninges. Then, tissues were mechanically dissociated and enzymatically disaggregated (0.25 % trypsin, 37 °C, 5 min). Obtained neuroblasts were plated on poly-L-ornithine-coated 96 wells plates (10 x 10^3 cells/well) in Neurobasal medium (GIBCO) supplemented with 2 % B27 (GIBCO), GlutaMAX (GIBCO) and penicillin (100 IU/mL)/streptomycin (100 µg/mL) solution (Capricorn). Cultures were maintained in a humidified incubator with 5 % CO_2 at 37 ºC. After 24 h, glial growth was inhibited with cytosine arabinose (10 µM).

The medium was changed once every 3-4 days, and plates were used for experiments at 12th *day in vitro* (DIV12).

Old 3xTg-AD astrocytic cultures

Astrocytes were purified from adult females 3xTg-AD (strain: B6;129-Tg (APPSwe, tauP301L)1Lfa Psen1(tm1Mpm)/Mmjax) as previously informed by us (Diaz-Amarilla et al. 2022). The astrocytes cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5 % CO_2 incubator, in DMEM (Capricorn) containing 10 % FBS (GIBCO), and penicillin (100 IU/mL)/streptomycin (100 µg/mL) solution (Capricorn) and the medium was changing every 3-4 days.

3xTg-AD ACM collection and titration

Confluent astrocytes monolayer flasks were incubated in DMEM containing 2 % FBS (GIBCO), and penicillin (100 IU/mL)/streptomycin (100 µg/mL) solution (Capricorn) for 24 h. After that, the medium was removed, and astrocytes were incubated for 24 h in Neurobasal medium containing GlutaMAX and penicillin (100 IU/mL)/streptomycin (100 µg/mL) solution and without B27 supplement. After 24 h, these conditioned media were collected, centrifuged at 1,000 × g for 10 min and maintained at -80 °C until its use. In order to determine the concentration that leads to 50-70 % of neuronal dead, the *3xTg-AD ACM* were titrated. At DIV 12 CxH_C57 neurons were treated for 24 h with different dilutions of the obtained *3xTg-AD ACM.* After that, neuronal survival was assessed by the MTT assay (Denizot and Lang 1986). Briefly, cells were incubated for 40 min at 37 °C with MTT (0.1 mg/mL final concentration), and formazan crystals formed were then dissolved in DMSO and measured spectrophotometrically at 570 nm.

Evaluation of the toxicity of the flavanones *per se* and their protective effects against a 5 h pretreatment of CxH_C57 with 3xTg-AD ACM

DIV 12 CxH_C57 neurons were treated for 24 h with flavanones (**1**-**4**) at different concentrations (0.001-100 µM) (dissolved in DMSO, 0.2 % final concentration), and then the % of neuronal survival was determined. To evaluate the neuroprotective effects of natural compounds, DIV 12 neurons were pre-treated with them for 5 h, and then exposed to *3xTg-AD ACM* induced-death (50-65 %) for 24 h. Then, neuronal survival was determined by the MTT assay as above described.

Compound 1 *in vitro* study on GSK-3β

In vitro GSK-3β inhibitory activity by compound **1** was tested using human recombinant GSK-3β Kinase Enzyme System (*Promega*, catalog #V1991), and *Kinase-Glo*^{TM} luminescent kinase kit (*Promega*, catalog #V6711) according to the previously published method (Baki et al. 2007). Briefly, 10 mM of compound **1** stock solution in DMSO was diluted in assay buffer to obtain the range of tested

concentrations (1-200 μM, final DMSO concentration > 1 %). 10 μL (22 ng) of GSK-3β, followed by 20 μL of assay buffer containing 25 μM substrate (GS-2 peptide), and ATP (1 μM) were added to each well of a white 96-wells plate. The reaction was stopped with 40 μL of *Kinase-Glo* reagent after 30 min of incubation at 30 °C. Glow-type luminescence was recorded after 10 min using a *GloMax® Discover Microplate Reader*. Compound **1** IC_{50} was estimated using *GraphPad Prism 6.0* software.

Compound 1 *in silico* studies on GSK-3β

Molecular docking of prenylated flavanone **1** was performed on GSK-3β protein. Multiple crystal structures (ensemble docking) were used to account for binding site flexibility. Apo crystals structure of mouse (Protein Data Bank entry –PDB- 6ae3) and human GSK-3β (PDB 1i09, 1q3w, 1q41 and 3q3b) were prepared with *UCSF Chimera* (Pettersen et al. 2004). Docking was executed using *DockingApp* engine, an *Autodock Vina* wrapper (Di Muzio et al. 2017). Blind docking was used as a first step to fully explore binding site space accessible for the flavonoid compound, and subsequently restricted to this space to maintain accuracy. Representations and contact information were gathered from *UCSF Chimera* (Pettersen et al. 2004) as well as *PLIP* (Salentin et al. 2015) and *ProteinsPlus* (Fährrolfes et al. 2017) web servers. Before assessing contact information, crystallographic waters were re-incorporated to the complexes and optimized by energy minimization in *USCF Chimera* software. Additionally, molecular dynamics simulations were performed with *NAMD* in the NPT ensemble and using explicit solvent and ionization (NaCl 0.15 M) (Phillips et al. 2020). Input files were prepared with vmd plugin *QwikMD*, setting up the following protocol: 20 K steps for minimization, 14.4 K steps for annealing (37 °C and pressure 1 atm. onwards), 500 K steps for equilibration, and two consecutive stages of molecular dynamics (2.5 M steps each) resulting in 10 ns running simulation (Humphrey et al. 1996; Ribeiro et al. 2016). As a proxy for affinity potential interaction energy was measured for the selected flavanones-GSK-3*β* complexes (compound **1**, compound **2** and compound **3** vs PDB 1i09, 1q3w, 1q41, 3q3b, 6ae3) and the reference co-crystallized ligands. For initial docking complexes two alternative conformations were explored. Free energy (affinity) calculations were performed with *VMD* plugin *CaFE* using the MM/PBSA method (implicit solvent) and sampling 150 frames from the last 3 ns of each simulation (Kollman et al. 2000; Liu and Hou 2016).

Compound 1 inhibitory activity of GSK-3β-dependent Tau phosphorylation

To determinate the influence of compound **1** on the level of GSK-3β- phosphorylated tau, DIV12 CxH_C57 neurons plated in 35 mm Petri dishes were pre-treated for 5 h with the flavanone at different concentrations (0.001-10 μM), and then injured with *3xTg-AD ACM* for 1.5 h. After that, medium was removed, and cells were lysed using buffer containing 50 mM Hepes (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1% Triton X-100 and complete protease inhibitor mixture. Protein quantification was achieved using a Bicinchoninic Acid (BCA) kit. The percentage of phosphorylated tau was then obtained using the ELISA Kit Mouse TAU

[pS199] (ThermoFisher_KMB7041) which is specific for GSK-3β-phosphorylated protein, following the product protocol.

Compound 1 effects on 3xTg-AD ACM-mediated neurotoxicity

Confluent astrocytic monolayers in 35 mm Petri dishes were incubated in DMEM containing 2 % FBS (GIBCO), and penicillin (100 IU/mL)/streptomycin (100 µg/mL) solution (Capricorn) for 24 h. After that, the medium was removed, and astrocytes were incubated for 24 h in Neurobasal medium containing GlutaMAX and penicillin (100 IU/mL)/streptomycin (100 µg/mL) solution and without B27 supplement. Then, astrocytes were treated with different concentrations of compound **1** (0.01-100 µM) for 24 h. After that time, the collected medium was centrifuged and used to expose DIV12 CxH_C57 neuronal cultures for 24 h. Neuronal survival was then determined by using MTT assay.

Compound 1 effects on transgenic astrocytic cultures of old symptomatic 3xTg-AD mice

Confluent astrocytic monolayers in 96-wells plates were incubated in DMEM containing 2 % FBS (GIBCO), and penicillin (100 IU/mL)/streptomycin (100 µg/mL) solution (Capricorn) for 24 h. After that, the medium was removed, and astrocytes were incubated for 24 h in Neurobasal medium containing GlutaMAX and penicillin (100 IU/mL)/streptomycin (100 µg/mL) solution and without B27 supplement. Then, astrocytes were treated with different concentrations of compound **1** (0.01-100 µM) for 24 h. After that time, astrocytes survival was then determined by using MTT assay.

Statistics

All assays were independently performed by testing six replicates, and results were expressed as media ± SD of three separate experiments, unless stated otherwise. The lethal concentration media (LC50) values were estimated using the *GraphPad Prism 6* software on a compatible computer. The results were analyzed by unidirectional analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey and Bonferroni's test for multiple comparisons using the mentioned software.

Author Contribution M.D.S. and F.A. obtained funding, designed the study, performed *in vitro* experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. F.A. also mentored to M.DS. and supervised the study. D.C. obtained funding, designed, performed and analyzed the in *silico* studies, and wrote the manuscript. R.D. assisted in *in vitro* experiments and data analysis. M.B. assisted in *in vitro* experiments. M.Z., L.M.G, A.M. performed *in vitro* experiments. M.A.P, A.R, J.G. M.G.O, E.S., J.A.A.C. together with the previously mentioned authors, reviewed and edited the manuscript. All the authors approved the final manuscript.

Acknowledgments We would like to thank all the team of CUDIM SPF centralized animal facility for their fundamental work in animal care and assistance lead by Dr. Fabiana Insaurralde and formerly Dr. Silvia Hernandez. Diego Carvalho also thanks MSc. Jorge Cantero for his technical assistance in VMD and NAMD tools.

Funding This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay) through a Postdoctoral fellowship granted to PhD. M. Daniela Santi [grant number PD_NAC_2018_1_149726], a doctoral fellowship granted to MSc. Diego Carvalho [grant number POS_NAC_2017_1_140673] and by the Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA). M.A. Peralta and M.G. Ortega, are members of the Researcher career of CONICET. F. Arredondo, R. Dapueto, A. Rey, J. Giglio, E. Savio and J.A. Abin Carriquiry are members of the National Research System (Sistema Nacional de Investigación, SNI, Uruguay).

Declarations

Ethical Approval All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (CEUA-CUDIM) as established by the National Committee of Animal Experimentation (CNEA), Montevideo, Uruguay.

Competing Interests The authors declare no competing interests.

References

Acosta C, Anderson HD, Anderson CM (2017) Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. J Neurosci Res 95:2430–2447. https://doi.org/10.1002/JNR.24075

Alzheimer's Association (2019) 2019 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's Dement 15:321–387. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010

Alzheimer's Disease International. (2022) 2022 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's Dement 18:700–789. https://doi.org/10.1002/alz.12638

Alzheimer's Disease International. (2020) 2020 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's Dement 16:391–460. https://doi.org/10.1002/alz.12068

Arredondo F, Echeverry C, Abin-Carriquiry J a, Blasina F, Antúnez K, Jones DP, Go Y-M, Liang Y-L, Dajas F (2010) After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. Free Radic Biol Med 49:738–47. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.020

Baki A, Bielik A, Molnár L, Szendrei G, Keserü GM (2007) A high throughput luminescent assay for glycogen synthase kinase-3β inhibitors. Assay Drug Dev Technol 5:75–83. https://doi.org/10.1089/adt.2006.029

Barbier P, Zejneli O, Martinho M, Lasorsa A, Belle V, Smet-Nocca C, Tsvetkov PO, Devred F, Landrieu I (2019) Role of tau as a microtubule-associated protein: Structural and functional aspects. Front Aging Neurosci 10:204. https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00204

Boots AW, Kubben N, Haenen GRMM, Bast A (2003) Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: Implication for quercetin supplementation. Biochem Biophys Res Commun 308:560–565. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01438-4

Bullock R (2006) Efficacy and safety of memantine in moderate-to-severe Alzheimer disease: The evidence to date. Alzheimer Dis Assoc Disord 20:23–29. https://doi.org/10.1097/01.WAD.0000201847.29836.A5

Clarke LE, Liddelow SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. Proc Natl Acad Sci U S A 115:E1896–E1905. https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115

Cummings J, Lee G, Zhong K, Fonseca J, Taghva K (2021) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021. Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv 7:e12179. https://doi.org/10.1002/TRC2.12179

Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods 89:. https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6

Di Muzio E, Toti D, Polticelli F (2017) DockingApp: a user friendly interface for facilitated docking simulations with AutoDock Vina. J Comput Aided Mol Des 31:213–218. https://doi.org/10.1007/s10822-016-0006-1

Diaz-Amarilla P, Arredondo F, Dapueto R, Boix V, Carvalho D, Santi MD, Vasilskis E, Mesquita-Ribeiro R, Dajas-Bailador F, Abin-Carriquiry JA, Engler H, Savio E (2022) Isolation and characterization of neurotoxic astrocytes derived from old triple transgenic Alzheimer's disease mice. Neurochem Int 159:. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105403

Echeverry C, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Midiwo JO, Ochieng C, Kerubo L, Dajas F (2010) Pretreatment with natural flavones and neuronal cell survival after oxidative stress: a structure-activity relationship study. J Agric Food Chem 58:2111–5. https://doi.org/10.1021/jf902951v

Fährrolfes R, Bietz S, Flachsenberg F, Meyder A, Nittinger E, Otto T, Volkamer A, Rarey M (2017) Proteins Plus: A web portal for structure analysis of macromolecules. Nucleic Acids Res 45:W337–W343. https://doi.org/10.1093/nar/gkx333

Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, et al (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. Lancet Neurol 14:388. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5

Hernandez F, Lucas JJ, Avila J (2013) GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 33 Suppl 1: https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129025

Hirokawa N, Funakoshi T, Sato-Harada R, Kanai Y (1996) Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. J Cell Biol 132:667–679. https://doi.org/10.1083/JCB.132.4.667

Hole KL, Williams RJ (2020) Flavonoids as an Intervention for Alzheimer's Disease: Progress and Hurdles Towards Defining a Mechanism of Action. Brain Plast 6:167–192. https://doi.org/10.3233/BPL-200098

Hooper C, Killick R, Lovestone S (2008) The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. 104:1433–1439. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x

Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: Visual molecular dynamics. J Mol Graph 14:33–38.

https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5

Iram T, Trudler D, Kain D, Kanner S, Galron R, Vassar R, Barzilai A, Blinder P, Fishelson Z, Frenkel D (2016) Astrocytes from old Alzheimer's disease mice are impaired in Aβ uptake and in neuroprotection. Neurobiol Dis 96:84–94. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.08.001

Jope RS, Mines MA, Beurel E (2011) Regulation of cell survival mechanisms in alzheimer's disease by glycogen synthase kinase-3. Int J Alzheimers Dis. https://doi.org/10.4061/2011/861072

Kollman PA, Massova I, Reyes C, Kuhn B, Huo S, Chong L, Lee M, Lee T, Duan Y, Wang W, Donini O, Cieplak P, Srinivasan J, Case DA, Cheatham TE (2000) Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. Acc Chem Res 33:889–897. https://doi.org/10.1021/AR000033J

Kulijewicz-Nawrot M, Verkhratsky A, Chvátal A, Syková E, Rodríguez JJ (2012) Astrocytic cytoskeletal atrophy in the medial prefrontal cortex of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. J Anat 221:252–262. https://doi.org/10.1111/J.1469-7580.2012.01536.X

Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung W-SS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, et al (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature 541:481–487. https://doi.org/10.1038/nature21029

Liu H, Hou T (2016) CaFE: a tool for binding affinity prediction using end-point free energy methods. Bioinformatics 32:2216–2218. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW215

Lynch C, Alzheimer's Disease International. (2019) World Alzheimer Report 2019. Alzheimer's Dement 16:e038255. https://doi.org/10.1002/alz.038255

Mahase E (2021a) Aducanumab: European agency rejects Alzheimer's drug over efficacy and safety concerns. BMJ 375:n3127. https://doi.org/10.1136/BMJ.N3127

Mahase E (2021b) FDA approves controversial Alzheimer's drug despite uncertainty over effectiveness. BMJ 373:. https://doi.org/10.1136/BMJ.N1462

Martínez-Busi M, Arredondo F, González D, Echeverry C, Vega-Teijido MA, Carvalho D, Rodríguez-Haralambides A, Rivera F, Dajas F, Abin-Carriquiry JA (2019) Purification, structural elucidation, antioxidant capacity and neuroprotective potential of the main polyphenolic compounds contained in Achyrocline satureioides (Lam) D.C. (Compositae). Bioorganic Med Chem 27:. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.047

Noble W, Olm V, Takata K, Casey E, Mary O, Meyerson J, Gaynor K, LaFrancois J, Wang L, Kondo T,

Davies P, Burns M, Veeranna, Nixon R, Dickson D, Matsuoka Y, Ahlijanian M, Lau LF, Duff K (2003) Cdk5 Is a Key Factor in Tau Aggregation and Tangle Formation In Vivo. Neuron 38:555–565. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00259-9

Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 24:1063–1070. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2003.08.012

Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A, Rodríguez JJ (2010) Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. Glia 58:831–838. https://doi.org/10.1002/GLIA.20967

Ossenkoppele R, Schonhaut DR, Schöll M, Lockhart SN, Ayakta N, Baker SL, O'Neil JP, Janabi M, Lazaris A, Cantwell A, Vogel J, Santos M, Miller ZA, Bettcher BM, Vossel KA, Kramer JH, Gorno-Tempini ML, Miller BL, Jagust WJ, et al (2016) Tau PET patterns mirror clinical and neuroanatomical variability in Alzheimer's disease. Brain 139:1551–1567. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWW027

Peralta MA, Santi MD, Agnese AM, Cabrera JL, Ortega MG (2014) Flavanoids from Dalea elegans: Chemical reassignment and determination of kinetics parameters related to their anti-tyrosinase activity. Phytochem Lett 10:260–267. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.10.012

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem 25:1605–1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084

Phillips JC, Hardy DJ, Maia JDC, Stone JE, Ribeiro J V., Bernardi RC, Buch R, Fiorin G, Hénin J, Jiang W, McGreevy R, Melo MCR, Radak BK, Skeel RD, Singharoy A, Wang Y, Roux B, Aksimentiev A, Luthey-Schulten Z, et al (2020) Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. J Chem Phys 153:044130. https://doi.org/10.1063/5.0014475

Prince MJ, Wimo A, Guerchet MM, Ali GC, Wu Y-T, Prina M (2015) World Alzheimer Report 2015 - The Global Impact of Dementia. Alzheimer's Disease International, London

Reitz C, Mayeux R (2014) Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Biochem Pharmacol 88:640–651. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024

Ribeiro J V., Bernardi RC, Rudack T, Stone JE, Phillips JC, Freddolino PL, Schulten K (2016) QwikMD — Integrative Molecular Dynamics Toolkit for Novices and Experts. Sci Reports 2016 61 6:1–14. https://doi.org/10.1038/srep26536

Ritchie CW, Ames D, Clayton T, Lai R (2004) Metaanalysis of Randomized Trials of the Efficacy and

Safety of Donepezil, Galantamine, and Rivastigmine for the Treatment of Alzheimer Disease. Am J Geriatr Psychiatry 12:358–369. https://doi.org/10.1097/00019442-200407000-00003

Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, Schroeder M (2015) PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. Nucleic Acids Res 43:W443–W447. https://doi.org/10.1093/nar/gkv315

Santi MD, Arredondo F, Carvalho D, Echeverry C, Prunell G, Peralta MA, Cabrera JL, Ortega MG, Savio E, Abin-Carriquiry JA (2020) Neuroprotective effects of prenylated flavanones isolated from Dalea species, in vitro and in silico studies. Eur J Med Chem 206:112718. https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112718

Santi MD, Peralta MA, Mendoza CS, Cabrera JL, Ortega MG (2017) Chemical and bioactivity of flavanones obtained from roots of Dalea pazensis Rusby. 27:1789–1794. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.058

Strang KH, Golde TE, Giasson BI (2019) MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration. Lab Investig 2019 997 99:912–928. https://doi.org/10.1038/s41374-019-0197-x

Stutzmann GE (2007) The pathogenesis of Alzheimers disease is it a lifelong “calciumopathy”? Neuroscientist 13:546–559. https://doi.org/10.1177/1073858407299730

Thal DR, Vandenberghe R (2016) Monitoring the progression of Alzheimer’s disease with τ-PET. Brain 139:1318–1320. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWW057

van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, Kanekiyo M, Li D, Reyderman L, Cohen S, Froelich L, Katayama S, Sabbagh M, Vellas B, Watson D, Dhadda S, Irizarry M, Kramer LD, Iwatsubo T (2022) Lecanemab in Early Alzheimer’s Disease. N Engl J Med. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948

Visser PJ, Reus LM, Gobom J, Jansen I, Dicks E, van der Lee SJ, Tsolaki M, Verhey FRJ, Popp J, Martinez-Lage P, Vandenberghe R, Lleó A, Molinuevo JL, Engelborghs S, Freund-Levi Y, Froelich L, Sleegers K, Dobricic V, Lovestone S, et al (2022) Cerebrospinal fluid tau levels are associated with abnormal neuronal plasticity markers in Alzheimer’s disease. Mol Neurodegener 17:. https://doi.org/10.1186/S13024-022-00521-3

Williams RJ, Mohanakumar KP, Beart PM (2021) Neuro-nutraceuticals: Natural products nourish the brain but be aware of contrary effects. Neurochem Int 150:105159. https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2021.105159

Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG (2020) Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. J Cent Nerv Syst Dis 12:1179573520907397. https://doi.org/10.1177/1179573520907397

1.3.1. Material suplementario 1 manuscrito neuroprotección por flavanonas preniladas

Para acceder al material suplementario 1 siga este **vínculo**.

X. ANEXOS

1. Publicaciones científicas vinculadas a la tesis

1.1. Publicación aislamiento y caracterización astrocitos 3xTgAD neurotóxicos: "*Isolation and characterization of neurotoxic astrocytes derived from adult triple transgenic Alzheimer's disease mice*", Diaz Amarilla P, Arredondo F, Dapueto R, Boix V, Carvalho D, Santi MD, Vasilskis E, Mesquita Ribeiro R, Dajas Bailador F, Abin Carriquiry JA, Engler H, Savio E. *Neurochemistry International* 159 (2022).
Doi: 10.1016/j.neuint.2022.105403

Neurochemistry International 159 (2022) 105403

Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuint

Isolation and characterization of neurotoxic astrocytes derived from adult triple transgenic Alzheimer's disease mice

Pablo Diaz-Amarilla [a,4], Florencia Arredondo [a,b,*,4], Rosina Dapueto [a], Victoria Boix [b], Diego Carvalho [b], María Daniela Santi [a], Elena Vasilskis [a], Raquel Mesquita-Ribeiro [c], Federico Dajas-Bailador [c], Juan Andrés Abin-Carriquiry [b,1], Henry Engler [a,**,2,3], Eduardo Savio [a,***,3]

[a] Area I+D Biomédica, Centro Uruguayo de Imagenología Molecular, 11600, Montevideo, Uruguay
[b] Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, 11600, Montevideo, Uruguay
[c] School of Life Sciences, Medical School Building, University of Nottingham, NG7 2UH, Nottingham, UK

ARTICLE INFO

Keywords:
Adult 3xTg-AD mice
Astrocytes
Neurodegeneration
Alzheimer's disease

ABSTRACT

Alzheimer's disease has been considered mostly as a neuronal pathology, although increasing evidence suggests that glial cells might play a key role in the disease onset and progression. In this sense, astrocytes, with their central role in neuronal metabolism and function, are of great interest for increasing our understanding of the disease. Thus, exploring the morphological and functional changes suffered by astrocytes along the course of this disorder has great therapeutic and diagnostic potential.

In this work we isolated and cultivated astrocytes from symptomatic 9-10-months-old adult 3xTg-AD mice, with the aim of characterizing their phenotype and exploring their pathogenic potential. These "old" astrocytes occurring in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's Disease presented high proliferation rate and differential expression of astrocytic markers compared with controls. They were neurotoxic to primary neuronal cultures both, in neuronal-astrocyte co-cultures and when their conditioned media (ACM) was added into neuronal cultures. ACM caused neuronal GSK3β activation, changes in cytochrome *c* pattern, and increased caspase 3 activity, suggesting intrinsic apoptotic pathway activation. Exposure of neurons to ACM caused different subcellular responses. ACM application to the somato-dendritic domain in compartmentalised microfluidic chambers caused degeneration both locally in soma/dendrites and distally in axons. However, exposure of axons to ACM did not affect somato-dendritic nor axonal integrity.

We propose that this newly described old 3xTg-AD neurotoxic astrocytic population can contribute towards the mechanistic understanding of the disease and shed light on new therapeutical opportunities.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a devastating neurological disorder characterized by an accumulation of senile plaques and neurofibrillary tangles (NFTs) containing the β-Amyloid (Aβ) peptide and the hyperphosphorylated microtubule-associated protein tau, respectively (Braak et al., 1993). Its main behavioural symptoms are progressive loss of memory and general cognitive function, while at the cellular level is characterized by synaptic dysfunction, axonal loss/degeneration and neuronal death (Adalbert and Coleman, 2013; Gómez-Isla et al., 1997; Jackson et al., 2019; Selkoe, 2002; Terry et al., 1991). Although multiple molecular mechanisms have been postulated among the list of

* Corresponding author. Area I+D Biomédica, Centro Uruguayo de Imagenología Molecular, 11600, Montevideo, Uruguay.
** Corresponding author.
*** Corresponding author.
E-mail addresses: florencia.arredondo@cudim.org (F. Arredondo), hengler@fmed.edu.uy (H. Engler), eduardo.savio@cudim.org (E. Savio).
[1] Present affiliation address: Laboratorio de Biofármacos, Institut Pasteur de Montevideo, 11600 Montevideo, Uruguay.
[2] Present affiliation address: Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
[3] These authors share the last position.
[4] These authors contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105403
Received 1 February 2022; Received in revised form 2 June 2022; Accepted 9 July 2022
Available online 16 July 2022
0197-0186/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

disease-relevant processes (Francis et al., 1999; Markesbery, 1997; Wang and Reddy, 2017), the cellular events and functional consequences of neurotoxic forms of Aβ and tau have taken central attention in AD research, leading to a great understanding of these actors in disease aetiology and progression (Hardy and Higgins, 1992; Selkoe and Hardy, 2016). Despite these efforts, the translation of this growing knowledge into advances at the clinical level has been limited (Liu et al., 2019). Indeed, one of the main concerns of AD research is the relative lack of wider mechanistic insights beyond Aβ and tau, and the scarcity of relevant preclinical models that can be used in the initial stages of drug development (Mullane and Williams, 2019).

Beyond the important role recognized for both Aβ and tau, it is now acknowledged that AD is a multifactorial chronic disease that involves a complex interplay between neurodegeneration, cerebrovascular pathology and inflammation, and where aging is its greatest risk factor (Heneka et al., 2015; Zlokovic, 2005). In this context, there has been a growing awareness about the need to expand neuron-centric viewpoints that have classically prevailed in experimental neurology, incorporating the important role of glia in physiological and pathological conditions. This need has been accompanied by increasing experimental data that highlighted glia involvement in neuro-inflammation and neuroprotection associated with the progression of diverse brain pathologies (Díaz-Amarilla et al., 2011; Liddelow and Barres, 2017; Siracusa et al., 2019).

Astrocytes are the glial cells responsible for brain homeostasis, with key roles in synapse formation/elimination, modulation of synapses and neuronal connectivity, antioxidant protection, blood flow regulation, energetic and trophic supply, as well as debris clearing (Santello et al., 2019; Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Astrocytes can also contribute to brain protection in pathology (Kettenmann and Ransom, 2013), and in the case of AD, they show morphological and functional changes that can affect the course of the disorder (Heneka et al., 2015; Olabarria et al., 2010). Furthermore, evidence indicates that there is an early imbalance in astrocytic function in AD, characterized by a heterogeneous morphology that is dependent on brain region and disease state (Kulijewicz-Nawrot et al., 2012; Olabarria et al., 2010). Previously, Iram and co-workers found that cultured astrocytes derived from old (12–14 months) transgenic animals of the heterologous mouse line Tg6799, also named 5xFAD, were functionally impaired in Aβ uptake and in neuronal support, proposing that these astrocytes were permanently affected following long-term exposure to an AD brain milieu in the animal model (Iram et al., 2016). Although restricted by the presence of only defined genetic modifications, transgenic animals play central roles as tools for improving our understanding of AD pathogenesis. The 3xTg-AD mouse model of AD is an attractive transgenic model that contains the Swedish mutation for human amyloid precursor protein (APPswe), plus mutated human presenilin 1 (Psen-1) and human tau mutation (tauP301L). Importantly, it develops both plaque and tangle pathology in AD-relevant brain regions, while showing age-dependent cognitive deficits, astrogliosis, and brain atrophy that are indicative of both synaptic and neuronal loss (Billings et al., 2005; Chiquita et al., 2019; Oddo et al., 2003). Previous evidence shows that immortalized hippocampal astrocytes from new-born 3xTg-AD mice had an impaired ability to support blood brain barrier integrity through paracrine mechanisms *in vitro* (Kriaučiūnaitė et al., 2021). Furthermore, astrocytes from new-born 3xTg-AD mice exhibited compromised vesicle trafficking *in vitro* (Stenovec et al., 2016). Recently, González-Molina and co-workers found that extracellular vesicles released by astrocytes from 8 to 9 months-old 3xTg-AD mice impaired cells from the neurovascular unit *in vitro* (González-Molina et al., 2021).

In our study, we isolated and cultured astrocytes from 9 to 10 months-old 3xTg-AD mouse model of AD with a high proliferation rate, a differential expression of astrocytic markers, and the capacity to mediate neuronal degeneration. The results add evidence to the hypothesis that environmentally-induced changes in astrocyte function during the progression of AD may in turn promote/accelerate neurodegeneration.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All reagents were acquired from Sigma unless otherwise stated. Commercial antibodies used in this study are detailed in table 1 of supplementary material (SM1).

2.2. Animals

All procedures using laboratory animals were performed in accordance with the international guidelines for the use of live animals and were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (CEUA-CUDIM) as established by the National Committee of Animal Experimentation (CNEA). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

Mice homozygous 3xTg-AD (B6; 129-Tg(APPSwe, tauP301L)1Lfa Psen 1(tm1Mpm)/Mmjax strain) (Oddo et al., 2003) and wild-type non-transgenic (Non-Tg) (B6129SF2/J and/or C57BL/6J strains) (The Jackson Laboratory) were bred and housed in CUDIM SPF centralized animal facility with a 12-h light-dark cycle with *ad libitum* access to food and water. All experiments were performed on female animals since sex differences in the development of the pathology have been described in this AD murine model (i.e, expression of plaques and tangles, behavioral deficits) with a greater expression of transgenes in females (Carroll et al., 2010; Clinton et al., 2007).

2.3. Astrocyte cultures from adult and neonatal mice

Depending on the experiment, mixed cortical and hippocampal primary astrocyte cultures were isolated from adult (9–10 months; 3xTg-AD or non-Tg) or new-born (postnatal day 0–2, 3xTg-AD or non-Tg) mice. After euthanasia, cerebral cortices were aseptically dissected and meninges were removed. The tissues were minced and then dissociated both enzymatically (0.25% trypsin, 37 °C, 10 min) and mechanically to obtain single cell suspension. After filtration through a mesh, the cell suspension was spun and resuspended in complete medium [DMEM (Capricorn) containing 10% FBS (GIBCO), and penicillin (100 IU/mL)/streptomycin (100 μg/mL) solution (Capricorn)]. The cells were plated in tissue flasks and then cultured at 37 °C in a humidified 5% CO_2 incubator.

In the case of astrocytes isolated from neonatal mice, once plated, the medium change occurred once every 2–3 days. When cells grew to confluence after approximately 10 days *in vitro* (DIV), flasks were vigorously shaken to remove the loosely attached contaminated microglia and oligodendrocyte progenitor cells (OPCs), then incubated for another 48 h with 10 μM cytosine arabinoside, and then amplified to flasks, 35 mm Petri dishes or 96-well plates for the different assays (Cassina et al., 2002). In the case of astrocytes isolated from adult mice, culture medium was removed after 7 DIV and then was replaced every 3–4 days. The flask was shaken to remove debris and possible cell contaminants when culture medium was changed. Cells were passaged for the first time at 21–28 DIV. To do so, the culture was incubated with trypsin (0.25% trypsin, 37 °C, 4 min). Then, the cells were harvested in complete medium and spun at 250×*g* for 10 min. The pellet was then resuspended in complete medium, and the cells were amplified to flasks, 35 mm Petri dishes or 96-well plates and maintained at 37 °C in a humidified 5% CO_2 incubator.

2.4. Primary neuronal cell cultures

Neurons from cortex and hippocampus were isolated from (E16-18) C57BL/6J embryos as previously reported, with minor modifications (Dajas-Bailador et al., 2014; Lucci et al., 2020). Embryo cortices were

aseptically dissected in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and meninges were removed. The tissues were minced and then enzymatically disaggregated (0.25% trypsin, 37 °C, 5 min), followed by mechanic disaggregation, to obtain single cells. Dissociated neurons were plated on poly-L-ornithine-coated 35 mm dishes (57×10^3 cells/cm^2) in complete medium [Neurobasal medium (GIBCO) supplemented with 2% B27 (GIBCO), GlutaMAX (GIBCO) and penicillin (100 IU/mL)/streptomycin (100 μg/mL) solution (Capricorn)], and maintained in a humidified incubator with 5% CO_2 at 37 °C. For studies of axonal integrity, neurons were grown in compartmentalised microfluidic devices (MFD; Xona Microfluidics LLC, Temecula, CA, USA; Cat #SND450) at a density of 8×10^4 cells per somatic compartment. By seeding the neuronal cultures in these devices, axons were fluidically isolated from the somato-dendritic compartment. For co-culture experiments, neurons (32×10^3 cells/cm^2) were plated on confluent monolayers of adult or neonatal astrocytes and maintained for 5 DIV in complete neuronal medium.

2.5. Astrocyte conditioned media (ACM) exposure in neuronal cultures

For preparation of ACM, astrocyte monolayers were incubated in serum-free DMEM medium for 24 h. Respective supernatants were centrifuged at 1.000×*g* for 10 min and conserved at −80 °C overnight. After 24 h, the ACM were lyophilized and conserved until its use at 4 °C.

Old 3xTg-AD ACM, neonatal 3xTg-AD ACM, and non-Tg ACM (previously lyophilized and reconstituted in sterile distilled water) were added (proportion 1:1 to the existing neuronal culture medium) at DIV12 to the neuronal cultures for 24 h. The effect of fresh (non-conditioned) medium, added at the same proportion, on neuronal cultures was also evaluated as control. In the case of neuronal cultures in microfluidic devices, at DIV12 Old 3xTg-AD ACM or neonatal non-Tg ACM was added either in the somatic compartment or in the axonal compartment for 24 h. To ensure the isolation of fluids between the different compartments, a volume difference of 50 μL was generated in favour of the untreated side. After treatments, cultured cells were fixed and processed for immunocytochemistry.

2.6. Astrocytes proliferation assay

Astrocytes were plated in 96-wells plates at a density of 6×10^3 cells/cm^2. Measurement of cellular protein content by the Sulforhodamine B assay (SRB), was used in order to assess proliferation rates of the different astrocyte cultures, according to Orellana and Kasinski with minor modifications (Orellana and Kasinski, 2016). The assay relies on SRB property for binding stoichiometrically to proteins under mild acidic conditions. Using basic conditions it can be extracted and the SRB bound can be used as an estimate for cell mass and thus be inferred to measure cell proliferation. After 5 h (to obtain the values of cell density of 0 DIV), or 1, 2, 5, 6 or, 8 DIV, cells layers were fixed to the well bottoms by adding 10% TCA and plates were incubated at room temperature for 1 h. Then, wells were rinsed twice with distilled water, and air dried. SRB (0,4% in 1% glacial acetic acid) was then added to the wells and incubated for 30min. After washing 3 times with 1% glacial acetic acid, plate was air dried and finally the dye was solubilized in Tris base (10 mM). Absorbance (570 nm) was measured on a microtiter plate reader (Fisherbrand™ AccuSkan™ FC Filter-Based Microplate Photometer). Ten to twenty replicate wells of each astrocyte culture were run for each time point, and SRB assay was performed independently twice.

2.7. Western blotting

Confluent monolayers of astrocytes were washed with PBS and then lysed with appropriate buffer containing 50 mM HEPES (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1% Triton X-100 and complete protease inhibitor mixture. Protein quantification was achieved using a Bicinchoninic Acid (BCA) kit. Protein samples were prepared in Laemmli sample buffer 5x, resolved on 12% SDS-PAGE gels and transferred onto PDVF membranes (BioRad) using a wet transfer system. Membranes were blocked in 5% dried milk in TBS-T (0.5 mM Tris base, pH 8, 75 mM NaCl and 0.2% Tween-20) for at least 2 h at room temperature. Membranes were incubated with primary antibody diluted in 2% BSA in TBS-T and then with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody diluted in 2% BSA in TBS-T for 1 h. Membranes were developed using chemiluminescent substrates (Thermo).

2.8. Immunocytochemistry

Cultured cells were fixed with cold 4% PFA for 20 min (or with ice-cold MeOH for 5 min, in the case of astrocytic cultures), washed with PBS/glycine, and permeabilized with 0.2% Triton-X100 for 30 min at room temperature. Unspecific binding sites were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA, MP Biomedicals) for 60 min, and labelling with primary antibodies was performed overnight at 4 °C. After incubation, cells were extensively washed with PBS/Triton-X100 and incubated with appropriate secondary antibodies at room temperature for 2 h. After nuclear staining with Hoechst 33342 or DAPI, samples were mounted and images were acquired in a ZEISS LSM 800-AiryScan laser scanning confocal microscope provided with a Zen Blue Edition V2.6 program or a Zeiss LSM880 confocal microscope provided with a Zen Black Edition V2.3 program.

2.9. Image analysis

All the analysis of images was performed using ImageJ software (http://rsb.info.nih.gov/ij) (Schneider et al., 2012).

2.9.1. Quantification of axonal integrity in microfluidic neuronal cultures exposed to ACM

For microfluidic devices, we employed an ImageJ macro previously developed by Sasaki et al. (2009) with minor modifications (Loreto et al., 2020). In order to statistically compare the status of the axons after the different ACM treatments, the Image J macro defines the following indexes: preservation, degeneration and fragmentation. The Index of Preservation (IP) is an index of the number of intact axons. It establishes a relationship between the total area occupied by all particles and the area occupied by particles larger than 1000 px with circularity between 0 and 1. The other two indexes, the Index of Degeneration (ID, particles size less than 1000 px, circularity 0–1) and the Index of Fragmentation (IF, particles size less than 1000 px, circularity 0,9–1) were utilized using the same ratio with respect to the total area. These indexes allowed us to statistically compare the level of degeneration and fragmentation of the axons after the different ACM treatments. Four random fields from axon compartment were analysed for each condition in 3 independent experiments, performed in duplicates each time. Data were normalized and expressed as mean ± S.D percentage compared to control (microfluidic neuronal cultures exposed to non-Tg ACM).

2.9.2. Quantification of viability in microfluidic neuronal cultures exposed to ACM

The viability after ACM treatments in the microfluidic devices was quantified with the Cell Counter plugin by visualization of Hoechst 33342-stained nuclei. Condensed nuclei were counted according the following criteria: nucleus size, presence or absence of nucleoli and cytoplasmic morphology. Four random fields from soma compartment were analysed for each condition in 3 independent experiments, performed in duplicates each time. For each condition, the ratio of condensed nuclei was normalized and expressed as mean ± S.D percentage respect to control (microfluidic neuronal cultures exposed to non-Tg ACM).

2.9.3. Quantification of caspase-3 activity in neuronal cultures exposed to ACM

The Colocalization Threshold tool was used for the quantification of the active caspase-3, to identify Hoechst 33342-stained nuclei and active caspase-3 cells, followed by the Cell Counter plugin. Eleven to thirteen random fields from cell cultures were analysed for each condition in 2 independent experiments. The percentage of active caspase-3 was calculated by comparing the active caspase-3 nuclei with the total number of nuclei, and expressed as mean ± S.D.

2.9.4. Quantification of active GSK3β in neuronal cultures

The GSK3β activation after ACM treatments in the neuronal cultures was quantified using the Cell Counter plugin with visualization of GSK3β in its active and inactive forms (GSK3β phosphorylated at Tyr^{216} and Ser^{21} residues, respectively). Random fields from cell cultures were analysed for each condition in 3 independent experiments. The percentage of active GSK3β was calculated by comparing the number of neurons labelled with anti-$pTyr^{216}$ GSK3β with the total number of neurons labelled with anti-$pSer^{21}$ and anti-$pTyr^{216}$ GSK3β, and expressed as mean ± S.D.

2.10. Statistical analysis

Data analysis was carried out using Prism v8.4.3 (GraphPad Software) and all data were expressed as mean ± S.D. All experiments were performed at least three independent times, unless otherwise stated (see specific section of each experimental design for details). The probability distribution of the data set was analysed using the Shapiro–Wilk normality test. Then the statistical evaluation between two groups was performed using unpaired two-tailed Student's t-test, while analyses of more than two groups were carried out using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-hoc test. When the normality test failed, comparison between two groups was performed by Kolmogorov-Smirnov test, and multiple comparisons were analysed with Kruskal-Wallis test followed by Dunn post-hoc test.

3. Results

3.1. Isolation of astrocytes from symptomatic 3xTg-AD animals

To investigate changes in astrocytes induced by brain milieu during the progression of AD, we isolated and cultured astrocytes derived from 9 to 10-months-old 3xTg-AD mice, a stage when glial reactivity has been already described for this model (Kreimerman et al., 2019; Oddo et al., 2003).

Mixed cortical and hippocampal astrocytic cultures were obtained from 4 different symptomatic 9-10-months-old adult 3xTg-AD mice. These isolated cultures produced clusters of cells, with some resembling elongated flat astrocytes that proliferated rapidly and continuously after the first passage *in vitro* (Fig. 1A). In subsequent passages, these cultures yielded layers of an enriched cell subpopulation characterized by flat, fusiform to polygonal morphology with overlapping processes, which were successfully cultured and studied until passage 15. These cells showed a marked staining with the typical astrocytic marker S100β, were negative for Iba1 and Olig 2 markers, and responded to Forskolin by inducing the growth of astrocytic processes, thus providing further confirmation of their astrocytic phenotype (Fig. 1B, SM2). In the case of non-Tg mice, one astrocytic culture was obtained from a total of 7 adults (9-10 months-old), but this yielded cells with limited growth potential (Fig. 1A).

3.2. Characterization of the old 3xTg-AD astrocytic population

In order to further characterize the astrocyte cultures derived from these adult 3xTg-AD mice, we evaluated the expression of the astrocyte markers Glial fibrillary acidic protein (GFAP), S100 calcium-binding protein β (S100β) and Connexin 43 (Cx43). Due to the low yield of astrocytes from old non-Tg mice, it was not possible to analyse them at the morphological and functional level with significant statistical power. Instead, astrocytic cultures derived from neonatal non-Tg animals were used as controls throughout the study. To provide a further comparison

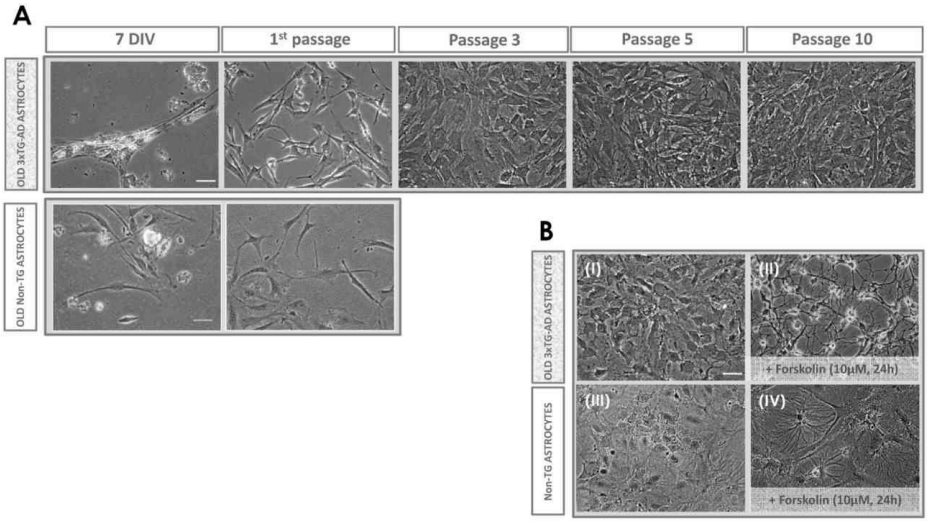


Fig. 1. Isolation of an astrocytic population occurring in symptomatic 3xTg-AD animals. A. Representative phase-contrast microphotographs of mixed cortex and hippocampal astrocytic cultures obtained from symptomatic 3xTg-AD 9-10-month-old mice (old 3xTg-AD astrocytes). Cells plated in culture flasks and observed at 7 days *in vitro* (7 DIV) and after replating at passage 1, 3, 5 and 10. Control "old" astrocytic cultures obtained from 1 adult 9-10-months-old non-Tg mouse yielded cells with limited growth potential (old non-Tg astrocytes). Scale bar: 50 μm. **B.** Representative microphotographs of phase-contrast old 3xTg-AD astrocytes and non-Tg neonatal astrocytes (I and III) showing response to Forskolin (10 μM, 24h) (II and IV). Scale bar: 50 μm.

in our experimental model, we also isolated astrocytic cultures from neonatal 3xTg-AD mice, thus examining whether the morphological and functional alterations observed in astrocytes were present in the pre-symptomatic phase of the disease.

When compared to these two other astrocytic cultures (neonatal non-Tg and 3xTg-AD), we observed that old 3xTg-AD astrocyte cultures showed a marked difference in the levels and patterns of expression of the astrocyte markers (Fig. 2). Importantly, neonatal 3xTg-AD astrocytic cultures didn't show differences in the expression of these markers respect to astrocytes derived from control neonatal non-Tg mice (Fig. 2).

As shown in Fig. 2A and B, we observed a notable reduction in GFAP expression in astrocytes derived from the old 3xTg-AD mice as compared with the two other astrocytic cultures, demonstrated by immunocytochemistry and Western blot (Fig. 2A and B). In addition, our old 3xTg-AD astrocytes exhibited a change in the pattern of staining of S100β protein compared with neonatal 3xTg-AD and non-Tg derived astrocytes (Fig. 2A). As well, we observed a markedly different cell distribution of Cx43 in old 3xTg-AD astrocytes compared with the two other astrocytic cultures (Fig. 2A). In the latter, punctiform distribution demonstrated the existence of sparse gap junctions at the cell surface in contrast with the intracellular localization visualized in the old 3xTg-AD astrocytes (Fig. 2A).

Subsequently, we investigated the expression of the enzyme Monoamino oxidase B (MAO-B), which has been primarily located in activated astrocytes (Ekblom et al., 1993; Saura et al., 1994). As shown in Fig. 2B, we found that the expression of MAO-B, although not significant, had a trend towards increase in old 3xTg-AD astrocytes compared with neonatal 3xTg-AD and non-Tg derived astrocytes (Fig. 2B).

In addition to the clear differences in the distribution and abundance of the key markers described above, old 3xTg-AD astrocytes showed a significant increase in the rate of proliferation compared to neonatal 3xTg-AD and non-Tg astrocytes (Fig. 2C).

3.3. Neurotoxic potential of old 3xTg-AD astrocytes

To investigate the pathogenic potential of these newly characterised old 3xTg-AD astrocytes we decided to use a neuron-astrocyte co-culture model. For this, mixed cortical and hippocampal neurons isolated from E16-18 non-Tg mice embryos were plated on confluent monolayer of old 3xTg-AD astrocytes, or 3xTg-AD and non-Tg neonates' astrocytic cultures. As shown in Fig. 3, after 5 DIV primary neurons could develop on non-Tg, and 3xTg-AD neonatal astrocytic cultures, showing extensive dendritic and axonal growth. However, we found a massive loss of neuronal cells when grown on top of the old 3xTg-AD astrocytic monolayers (Fig. 3). Importantly, passage number after initial culture did not significantly change the observed functional and morphological characterization of these old 3xTg-AD astrocytic cultures (from passages 2 to 15), with all showing similar results.

We next explored whether the effect exerted by these astrocytes was mediated via soluble factors secreted to the cellular environment. For this, we evaluated the effect on neuronal cultures following addition (24h) of conditioned medium from old 3xTg-AD astrocytes (old 3xTg-AD ACM) or controls. We observed that exposure of neuronal cultures to fresh (non-conditioned) medium, ACM from non-Tg, or ACM from 3xTg-AD neonates control astrocytic cultures did not affect neuronal viability, whereas ACM from old 3xTg-AD dramatically impacted neuronal viability (Fig. 4).

3.4. Cellular mechanisms underlying old 3xTg-AD astrocyte neurotoxic effects

In order to see if old 3xTg-AD astrocyte neurotoxic effects were the result of their secretion of Aβ to the cellular environment, we analysed the effect of an inhibitor of γ-secretase, the pivotal enzyme that generates Aβ, on old 3xTg-AD ACM. Blocking Aβ generation *in vitro* by tert-

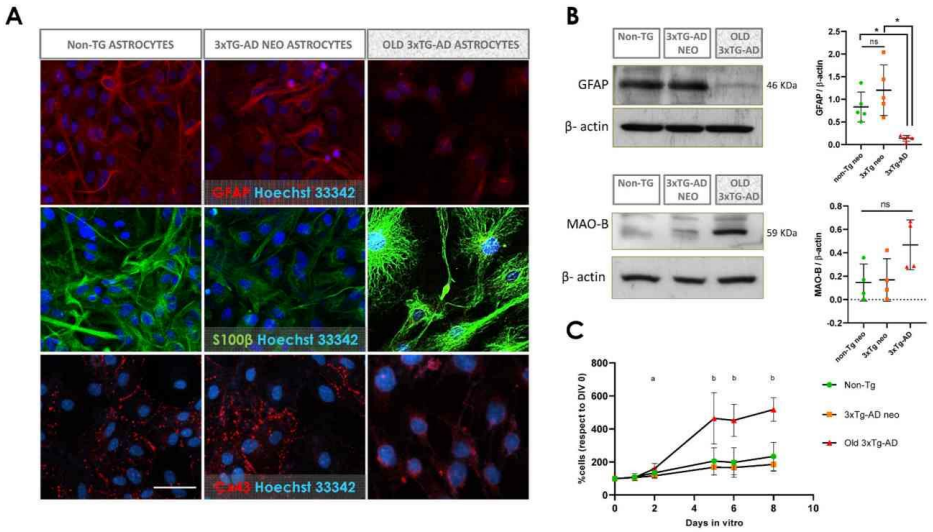


Fig. 2. Protein expression in old 3xTg-AD astrocytic cultures (old 3xTg-AD) compared with non-Tg neonates (non-Tg) and 3xTg-AD neonates (3xTg-AD neo) astrocytic cultures. A. Astrocytes in culture were analyzed by confocal immunofluorescence for the expression of GFAP (red), S100β (green) and Connexin-43 (red). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 50 μm. **B.** Western blotting analysis of GFAP and MAO-B proteins in old 3xTg-AD astrocytic cultures and corresponding controls (Non-Tg and 3xTg-AD neo). β-actin was used as loading control. Representative figures and relative quantification of almost 3 independent immunoblots. Data are mean ± SD; One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-hoc test. **C.** Growth of old 3xTg-AD astrocytes, non-Tg and 3xTg-AD neonatal astrocytes was assessed over 8 days by SRB assay (10–20 replicates of each time point, performed in 2 independent experiments). Data are mean ± SD; Two -way ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-hoc test. a: $p < 0.05$, 3xTg-AD neo significantly different from old 3xTg-AD; b: $p < 0.05$, non-Tg and 3xTg-AD neo significantly different from old 3xTg-AD.

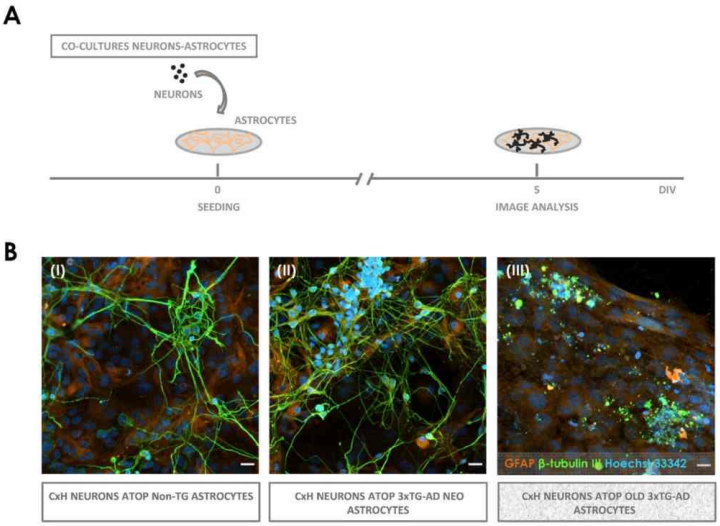


Fig. 3. Old 3xTg-AD astrocytes in co-culture showed neurotoxic effects. A: Diagrammatic representation of the experimental design used in B. **B:** Representative confocal immunofluorescence microphotographs of co-cultures at 5DIV. Embryonic non-Tg cortico-hippocampal (CxH) neurons were seeded on top of confluent feeder layers of neonatal non-Tg astrocytes (I), neonatal 3xTg-AD astrocytes (II), or old 3xTg-AD astrocytes (3rd passage) (III), and after 5 days cultures were fixed with PFA 4% and processed for immunocytochemistry. Fixed co-cultures were immunostained against GFAP (orange)/β-tubulin III (green) and nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 20 μm.

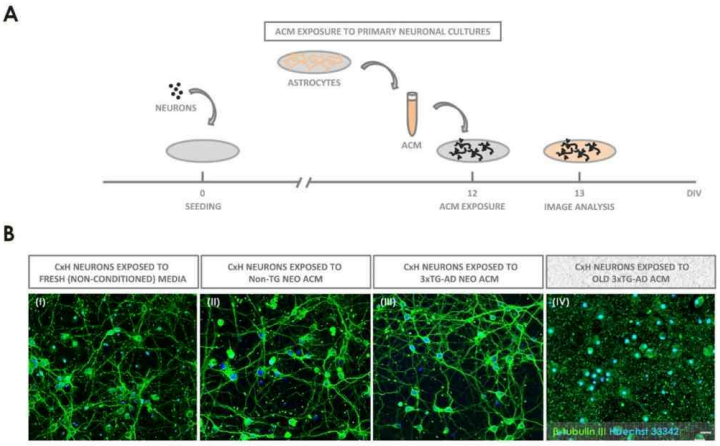


Fig. 4. Conditioned medium from old 3xTg-AD astrocytes (old 3xTg-AD ACM) induced primary cortico-hippocampal neurons death. A: Diagrammatic representation of the experimental design used in B. **B:** Representative confocal immunofluorescence microphotographs of neuronal cultures at 13DIV. ACM from neonatal non-Tg astrocytes (II), neonatal 3xTg-AD astrocytes (III), or old 3xTg-AD astrocytes (IV) was added (proportion 1:1 to the existing neuronal culture medium) to embryonic non Tg CxH neurons at 12DIV for 24hs. The effect of fresh (non-conditioned) medium on neuronal cultures was also evaluated as control (I). After ACM exposure, cells were fixed with PFA 4% and processed for immunocytochemistry. Fixed cultures were immunostained against β-tubulin III (green) and nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 20 μm.

Butyl (S)-{(2S)-2-[2-(3,5-difluorophenyl) acetamido] propanamido} phenylacetate (DAPT) did not prevent old 3xTg-AD ACM neurotoxic effects (SM3), suggesting that Aβ may not underlie neurotoxicity of these old 3xTg-AD astrocytes.

Furthermore, to provide evidence for the underlying cellular mechanisms of neurodegeneration occurring in our cellular model, we explored GSK3β activity. Interestingly, exposure of primary neurons to old 3xTg-AD ACM, produced changes in GSK3β phosphorylation state, when compared to neuronal cultures exposed to 3xTg-AD neonates control ACM (Fig. 5A and B). Our results showed neuronal cultures with a significantly higher percentage of active GSK3β (pGSK3β-Y216) after addition of old 3xTg-AD ACM (Fig. 5B). To further explore potential mechanisms of toxicity, we investigated the cytochrome *c* expression pattern and caspase-3 activity following old 3xTg-AD ACM application. We found that old 3xTg-AD ACM also caused changes in cytochrome *c* pattern and a significant increase in caspase-3 activity, when compared to neuronal cultures treated with 3xTg-AD neonates control ACM (Fig. 5C and D).

3.5. *Differential local effect of old 3xTg-AD ACM in neuronal cultures*

Taking into account the polarized nature of neuronal organisation, at the morphological and functional level, and the importance that this has in degenerative mechanisms, it was important to explore whether sub-cellular compartments (somato-dendritic or axonal) might respond differently to the observed mediators of neuronal toxicity. For this, we used a compartmentalized microfluidic device which allows fluidic isolation of axonal and somato-dendritic compartments. In this way, we could compare the effect of old 3xTg-AD ACM and non-Tg control ACM, following 24 h exposure at either somato-dendritic or axonal level. Our results demonstrate that old 3xTg-AD ACM caused radically different cellular responses that were specific to the sub-cellular compartment. As

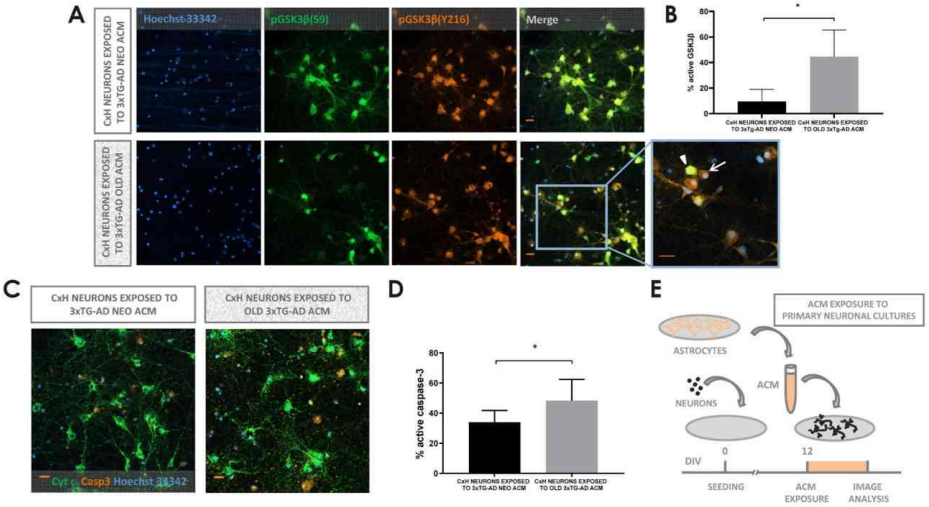


Fig. 5. Exposure of primary CxH neurons to old 3xTg-AD ACM induced an increase in the percentage of active GSK3β, in cytochrome *c* pattern, and an increase in caspase 3 activity, indicative of intrinsic apoptotic pathway activation. A-C: Representative confocal immunofluorescence microphotographs of neuronal cultures treated with ACM from neonatal 3xTg-AD astrocytes (3xTg-AD neo ACM), or from old 3xTgv astrocytes (old 3xTg-AD ACM) for 1h 30min (A) or for 3h (C). After ACM exposure, cells were fixed with PFA 4% and processed for immunocytochemistry. Fixed co-cultures were immunostained against pGSK3β(S9) (inactive, green) and against pGSK3β(Y216) (active, orange), or against Cytochrome *c* (Cyt *c*, green) and against active Caspase 3 (Casp 3, orange) (A and C, respectively). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 20 μm. **B:** Quantitative analysis of active GSK3β immunofluorescence in neuronal cultures exposed to ACM, n = 3. Data are mean ± SD; Kolmogorov-Smirnov test, *p < 0.001. **D:** Quantitative analysis of active caspase 3 immunofluorescence in neuronal cultures exposed to ACM, n = 2. Data are mean ± SD; Kolmogorov-Smirnov test, *p < 0.01. **E.** Diagrammatic representation of the experimental design used in A and C.

shown in Fig. 6, addition of old 3xTg-AD ACM to the somato-dendritic surface caused complete neuronal degeneration, shown both locally in the somato-dendritic compartment and also in distal axons not exposed to the media. Surprisingly, when only axons were exposed to old 3xTg-AD ACM we observed no sign of degeneration and/or damage (both at axonal and retrogradely at somato-dendritic level), with fragmentation levels even lower than non-Tg control ACM (Fig. 6).

4. Discussion

In pathological situations leading to neuronal degeneration as in AD, astrocytes acquire a reactive state characterized by molecular and cellular changes. Depending on the stage of the disease, gliosis can be a supportive or deleterious event for neuronal survival (Anderson et al., 2014; Sofroniew, 2020). In our study, we reported the morpho-functional characterisation of astrocytes from 9 to 10 months-old 3xTg-AD mouse model of AD, providing an important contribution towards the understanding of the changes adopted by astrocytes during the progression of AD.

In order to fully characterize these newly described astrocytes from old 3xTg-AD it was important to investigate their pattern of expression of key markers, including GFAP, S100β, Cx43 and MAO-B. As shown previously (Sofroniew, 2009) astrocytic expression of GFAP shows regional variability that is dynamically regulated in a context-dependent manner. Accordingly, in the 5xFAD AD mouse model, a continuous range of astrocytic subpopulations have been defined, ranging from GFAP-high to GFAP-low state (Habib et al., 2020), with even GFAP-negative astrocytes found in the adult CNS (Tatsumi et al., 2018). Interestingly, we found that our cultured old 3xTg-AD astrocytes show a notable reduction in GFAP expression combined with a high proliferative capacity (Fig. 2). It has been previously reported that neither aging nor AD condition are associated with a change in the overall number of GFAP positive astrocytes in the 3xTg-AD mouse model (Olabarria et al., 2010), which has been previously argued as a lack of increased astrocytic proliferation in AD. Nevertheless, our results suggest that there could be astrocytic subpopulations with low GFAP expression but with high proliferative properties, and which could account for the progressive pathological events occurring in this mouse model. In the case of the marker S100β, it is a small dimeric metal-binding astrocyte-derived protein and its over-expression is a prominent and consistent feature of AD (Cirillo et al., 2015; Marshak et al., 1992; Yeh et al., 2015). Furthermore, secreted S100β can act as a pro-inflammatory cytokine and a DAMP molecule, depending on its concentration, activating NF-κβ and RAGE (Leclerc et al., 2010). It regulates the intracellular levels of free calcium in neurons promoting Aβ formation and tau hyperphosphorylation, leading to an increase in cytosolic calcium levels and formation of calcium permeable pores. This can trigger neuronal apoptosis and the formation of free radicals through mitochondrial dysfunction (Cristóvaõ and Gomes, 2019). Interestingly, S100β modulates GFAP phosphorylation and promotes its disassembly (Bianchi et al., 1993). Although GFAP and S100β have been widely used as co-markers of astrocytes in brain injury, their pattern of expression can be shown to differ temporally and regionally at times. For example, previous studies in adult mice, animal models with brain pathologies, and human AD samples have shown opposite changes in GFAP and S100β labelling in astrocytes (Díaz-Amarilla et al., 2011; Kamphuis et al., 2014; Tatsumi et al., 2018; Yasuda et al., 2004). This is in line with our own findings from old 3xTg-AD astrocyte cultures. Cx43 is the major component of astrocytes' gap junctions, and it has been involved in the regulation of cell proliferation as well (Dermietzel et al., 1989; Giaume and Theis, 2010; Huang et al., 1998; Zhu et al., 1992). Several brain inflammatory events and pathologies that affect neuronal survival, including AD, stroke, and seizures, among others, have been associated with changes in the expression of astrocytic connexins and the aberrant

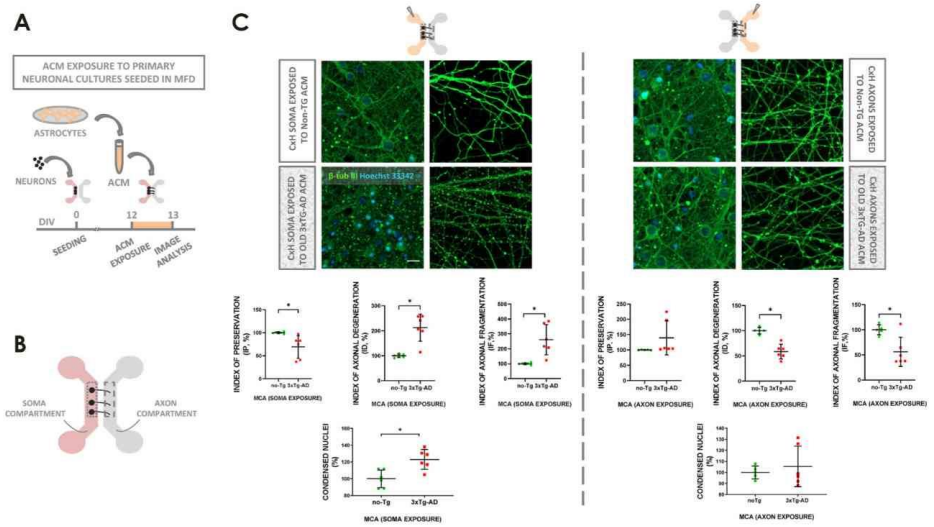


Fig. 6. Old 3xTg-AD ACM induced a differential effect in primary CxH neurons depending on the site of exposure. A. Diagrammatic representation of the experimental design used in C. **B.** Microfluidic Neuron Device diagram (MFD, SND450 standard neuron device, Xona Microfluidics). The wells on the left (light pink, soma compartment) are connected by a main channel as are the wells on the right (grey, axon compartment). Each compartment is connected by a 450 μm microgroove barrier (space). 3 neurons are represented. Note that only axons can reach the right chamber after 12 DIV (Taylor et al., 2005). **C.** Representative images of soma and axonal sides of the microfluidic chambers 24h after Non-Tg or old 3xTg ACM exposure. Schematics of the microfluidic chambers (above the graphs) depict where ACM were added (soma exposure in left, axonal exposure in right). ACM application is illustrated in orange. After ACM exposure, cells were fixed with PFA 4% and processed for immunocytochemistry. Fixed cultures were immunostained against β-tubulin III (green) and nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 20 μm. Quantification of condensed nuclei and indexes of axonal preservation, degeneration and fragmentation after ACM application in the soma (left) or axon side (right) of microfluidic chambers, n = 3. Data are mean ± SD; Student's *t*-test.

functioning of gap junctions. In this sense, it has been postulated that alterations of the astrocyte gap junctional communication may affect the neuroprotective role of astrocytes and account for a glial contribution to neurodegenerative processes (Kielian and Esen, 2004; Rouach et al., 2002). Even more, our findings showed different cell distribution of Cx43 in old 3xTg-AD astrocytes, with predominant intracellular localization (Fig. 2). In the same way MAO-B had a tendency to increase in old 3xTg-AD astrocytes, although not significant (Fig. 2B). MAO-B is a key synthesizing enzyme of glial GABA through the putrescine degradation pathway, and evidence showed that in the postmortem brain of AD patients, astrocytic GABA and MAO-B are significantly upregulated (Adolfsson et al., 1980; Garaschuk and Verkhratsky, 2019). As well, MAO-B has been postulated as responsible for the marked increase in GABA levels found in reactive astrocytes of APP/PS1 mice through the putrescine degradation pathway (Jo et al., 2014). Furthermore, previous studies have reported conflicting findings about reactive astrogliosis markers in human AD brain, and suggest that activated astrocytes assessed by GFAP may differ from those assessed using the MAO-B radiotracer ^{3}H-L-deprenyl, depending on the stage of disease progression (Gulyás et al., 2011; Marutle et al., 2013; Rodriguez-Vieitez et al., 2016). This is in line with our results, where the isolated old 3xTg-AD astrocytic subpopulation is characterized by low GFAP expression and a high, though not significant, MAO-B expression.

Another key feature of these isolated old 3xTg-AD astrocytes is their proliferative potential, when compared to their aged-matched non-Tg astrocytic culture (Fig. 1A). Likewise, although they took longer than neonatal-derived astrocytic cultures to attain first passaging conditions following isolation, they subsequently proliferated rapidly and continuously *in vitro*, with a higher proliferation rate, suggesting the progressive enrichment of a highly-proliferative astrocytic subpopulation (Figs. 1A and 2C).

Under physiological conditions, astrocytes are fundamental for neuronal growth and viability. Nevertheless, it has been suggested that in diverse brain pathologies including ALS, ischemia and AD, astrocyte reactivity involves a gain of neurotoxic function and/or loss of their neuroprotective properties (Díaz-Amarilla et al., 2011; Iram et al., 2016; Liddelow et al., 2017; Perez-Nievas and Serrano-Pozo, 2018; Villarreal et al., 2016). In line with this, an additional functional feature of these old 3xTg-AD astrocytes was their capacity to mediate neuronal degeneration (Fig. 3). Although we cannot specifically conclude whether the observed exacerbated neurotoxic effects of these old 3xTg-AD astrocytes are due to the "old" and/or "AD" characteristics, it should be noted that neonatal 3xTg-AD astrocytic cultures did not show such toxic profile. As a result, it is possible to speculate that, in spite of the presence of AD-related genes, the physiological astrocytic supporting role might be impacted mostly as a result of the brain milieu-induced compensatory changes during the pathology progression in the 3xTg-AD mice model.

The observed astrocyte reactivity may involve the release of deleterious soluble factors that can affect neurons (Bahniwal et al., 2017; González-Reyes et al., 2017). In accordance, we showed that ACM from old 3xTg-AD caused a massive decrease in neuronal viability (Fig. 4). Understanding the mechanisms involved in this toxic profile remains critical for the search of putative targets for AD intervention. Evidence suggests that astrocytes may contribute to amyloid burden in the brain in AD by secreting significant amounts of Aβ (Frost and Li, 2017). Nevertheless, our results showed that Aβ production may not underlie neurotoxicity of old 3xTg-AD astrocytes (SM3). Another important amount of data postulate Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3β) to play a central role in AD, since its deregulation results in several pathological hallmarks of the disease (Hooper et al., 2008). GSK3β function in the brain is associated with cell cycle, neural development, neuron polarization, and neurodegeneration (Bonda et al., 2010; Seira and Del

Río, 2014). Due to its relevant role in fundamental processes including cell structure, metabolism, and gene expression, GSK3β activity is subject to tight regulation, where its enzymatic activity is mainly inhibited by phosphorylation of serine-9 (pGSK3β-S9) or enhanced by phosphorylation of tyrosine-216 residue (pGSK3β-Y216). Evidence suggests that GSK3β over-activity is involved in tau hyper-phosphorylation, memory impairment, increased Aβ production and in inflammatory responses; all of which are pathological processes occurring in AD (Hooper et al., 2008). Our results point in the direction of this role for GSK3β, demonstrated by the increase in active GSK3β in the neuronal cultures after addition of old 3xTg-AD ACM (Fig. 5A and B). Furthermore, cell survival is supported by pro-survival apoptosis-related GSK3β substrates which, when GSK3β activity is low, avoid phosphorylation and hence proteasome-mediated degradation. Numerous studies have demonstrated that inhibition of GSK3β activity protects neurons from a wide range of environmental stresses, including amyloid toxicity, which may be relevant for treatment of AD (Jope et al., 2011). Besides, among the known mechanisms that may contribute to neuronal loss in AD brain, the intrinsic apoptotic signalling pathway has predominated in studies of Alzheimer's disease (Bijur et al., 2000; Jope et al., 2011; Lucas et al., 2001; Pap and Cooper, 1998). GSK3β promotes mitochondria-mediated intrinsic apoptotic signalling pathway as a result of a wide array of insults including DNA damage, oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress, among others. This apoptotic process involves among others key actors, GSK3β, Cytochrome-c and caspase-3 participation (Beurel and Jope, 2006). In this sense, our results suggest that exposure to old 3xTg-AD ACM may cause intrinsic apoptotic pathway initiation in the primary neuronal cultures (Fig. 5).

It is noteworthy to mention that axonal degeneration is a common feature in neurodegenerative diseases including AD. Together with synaptic loss, impairment of axonal homeostasis is comprised as an early event in AD, and appears to precede somatic cell death (Adalbert and Coleman, 2013). Furthermore, it has been proposed that these degenerative events may occur along neuronal networks, and be spread through neuronal projections (Braak and Tredici, 2018; Saper et al., 1987; Vogel et al., 2020). In line with the diverse molecular mechanisms at play in specific sub-cellular compartments, we show important differences in neuronal outcome following localised exposure of neurons to old 3xTg-AD ACM in compartmentalised microfluidic chambers (Fig. 6). Previous studies have demonstrated that Aβ axonal exposure is sufficient to trigger retrograde soma degeneration (Walker et al., 2018). Yet, Aβ somatic exposure can induce anterograde axonal degeneration (Deleglise et al., 2014). In the case of old 3xTg-AD ACM exposure, our results suggest that signalling molecules secreted by old 3xTg-AD astrocytes would have differential effects to neuronal subdomains. On one hand, ACM application to the somato-dendritic domain caused degeneration both locally in soma/dendrites and distally in axons (Fig. 6). Rather surprisingly, exposure of axons to ACM did not affect somato-dendritic nor axonal integrity. Moreover, axons exposed to old 3xTg-AD ACM showed fragmentation levels significantly lower than non-Tg control ACM (Fig. 6). The differential effects could be explained by a combination of both neurotoxic and neurotrophic molecules released by old 3xTg-AD astrocytes, with the latter being potentially interpreted as "growth-promoting" in isolated axons, but triggering cell death in post-mitotic neurons at the somatic level. In this way, a single type of old 3xTg-AD ACM component could have opposing effects depending on the subcellular location of its molecular target. This can be the case of neurotophins/pro-neurotrophins like nerve growth factor (NGF) whose release by astrocytes has been proposed to have a role in the progression of AD (Fahnestock and Shekari, 2019; Sáez et al., 2006; Sycheva et al., 2019). Analysis of ACM composition would undoubtedly help to better characterize the underlying mechanisms of old 3xTg-AD astrocytes' neurotoxic/trophic effects. In line with this, ACM proteomic studies that are currently in progress will complement the morpho-functional features of the old 3xTg-AD astrocytes presented here.

From our results, some questions arise regarding the relevance of this astrocytic population in the AD brain. When do old 3xTg-AD astrocytes appear *in vivo*? For how long are they present? Additionally, does their function change during disease progression? Are old 3xTg-AD astrocytes a putative target option in therapeutic development, either the cells themselves, or a specific molecule expressed in these cells? Accordingly, on-going *in vivo* longitudinal studies in these mice as well as transcriptomic and metabolomic analysis will provide additional information about the old 3xTg-AD neurotoxic astrocytic population, and help us to obtain a more unified understanding of astrocyte functions throughout AD progression.

5. Conclusions

Overall, our findings revealed the existence of an astrocytic population during the symptomatic phase of the AD disease model, with a differential expression of astrocytic markers, high proliferation rate, and gain of toxic/degenerative effects to neurons *in vitro*. This highly neurotoxic population was only identified when astrocytes were isolated from adult symptomatic 3xTg-AD mice and not from neonates 3xTg-AD at a pre-symptomatic phase of the disease or non-Tg mice. This observation suggests that the appearance of this astrocytic sub-population is linked to the progression of the pathological events occurring in the 3xTg-AD mice model, in accordance with previous evidence from other ALS and AD animal models (Díaz-Amarilla et al., 2011; Gomes et al., 2020; Iram et al., 2016). Their generation may not be simply a reflection of the presence of AD-related genes. Instead it could be associated with the neuroinflammatory milieu that evolves during the progression of the disease in these animals, and promotes the phenotypic transition of precursors to the generation of these cells.

The demonstrated pathogenic profile of these old 3xTg-AD astrocytes provides a novel *in vitro* model of AD that would improve our understanding on the degenerative progression in AD. Further comprehension about their pathological potential may contribute to emerging cell-specific therapies of this neurodegenerative disorder.

Funding

This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (grant numbers MOV_CA_2016_1_128717, PD_NAC_2018_1_149726, POS_NAC_2017_1_140673), UK Embassy in Montevideo (grant number: UK_ID_2015-1-7), and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

Author statement

Pablo Diaz-Amarilla: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - Original Draft; **Florencia Arredondo:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Original Draft, Visualization, Writing - Review & Editing; **Rosina Dapueto:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - Review & Editing; **Victoria Boix:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Visualization; **Diego Carvalho:** Investigation, Formal analysis; **María Daniela Santi**: Methodology, Investigation, Writing, Formal analysis, Visualization; **Elena Vasilskis:** Conceptualization, Methodology, Investigation; **Raquel Mesquita-Ribeiro:** Methodology, Writing - Review & Editing; **Federico Dajas-Bailador:** Methodology, Writing - Review & Editing; **Juan Andrés Abin-Carriquiry:** Conceptualization, Writing - Review & Editing; **Henry Engler:** Conceptualization, Writing - Review & Editing; **Eduardo Savio:** Resources, Writing - Review & Editing.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgments

This article is dedicated to the memory of our dear colleague and friend Pablo Díaz-Amarilla, whose scientific contributions were the key component of this work. Pablo left an indelible mark on us as an excellent scientist and as a great person.

We specially thank Dr. Andrés di Paolo from the Confocal Facility of the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, for his excellent technical support. We also gratefully acknowledge the Advanced Bioimaging Unit at the Institut Pasteur de Montevideo for their support and assistance in the present work. We would like to thank all the team of CUDIM animal facility as well for their fundamental work in animal care and assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105403.

References

Adalbert, R., Coleman, M.P., 2013. Review: axon pathology in age-related neurodegenerative disorders. Neuropathol. Appl. Neurobiol. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01308.x.

Adolfsson, R., Gottfries, C.G., Oreland, L., Wiberg, Winblad, B., 1980. Increased activity of brain and platelet monoamine oxidase in dementia of Alzheimer type. Life Sci. https://doi.org/10.1016/0024-3205(80)90025-9.

Anderson, M.A., Ao, Y., Sofroniew, M.V., 2014. Heterogeneity of reactive astrocytes. Neurosci. Lett. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030.

Bahniwal, M., Little, J.P., Klegeris, A., 2017. High glucose enhances neurotoxicity and inflammatory cytokine secretion by stimulated human astrocytes. Curr. Alzheimer Res. 14, 731–741. https://doi.org/10.2174/1567205014666170117104053.

Beurel, E., Jope, R.S., 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. Prog. Neurobiol. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.07.006.

Bianchi, R., Giambanco, I., Donato, R., 1993. S-100 protein, but not calmodulin, binds to the glial fibrillary acidic protein and inhibits its polymerization in a Ca2+-dependent manner. J. Biol. Chem.

Bijur, G.N., De Sarno, P., Jope, R.S., 2000. Glycogen synthase kinase-3β facilitates staurosporine- and heat shock- induced apoptosis. Protection by lithium. J. Biol. Chem. https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.7583.

Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., LaFerla, F.M., 2005. Intraneuronal Aβ causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. Neuron. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.040.

Bonda, D.J., Lee, Hyun-pil, Kudo, W., Zhu, X., Smith, M.A., Lee, Hyoung-gon, 2010. Pathological implications of cell cycle re-entry in Alzheimer disease. Expert Rev. Mol. Med. 12, e19. https://doi.org/10.1017/S146239941000150X.

Braak, H., Braak, E., Bohl, J., 1993. Staging of alzheimer-related cortical destruction. Eur. Neurol. https://doi.org/10.1159/000116984.

Braak, H., Tredici, K. Del, 2018. Spreading of tau pathology in sporadic Alzheimer's disease along cortico-cortical top-down connections. Cereb. Cortex. https://doi.org/10.1093/cercor/bhy152.

Carroll, J.C., Rosario, E.R., Kreimer, S., Villamagna, A., Gentzschein, E., Stanczyk, F.Z., Pike, C.J., 2010. Sex differences in β-amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid hormone exposure. Brain Res 1366, 233–245. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.009.

Cassina, P., Peluffo, H., Pehar, M., Martinez-Palma, L., Ressia, A., Beckman, J.S., Estévez, A.G., Barbeito, L., 2002. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. J. Neurosci. Res. https://doi.org/10.1002/jnr.10107.

Chiquita, S., Ribeiro, M., Castelhano, J., Oliveira, F., Sereno, J., Batista, M., Abrunhosa, A., Rodrigues-Neves, A.C., Carecho, R., Baptista, F., Gomes, C., Moreira, P.I., Ambrósio, A.F., Castelo-Branco, M., 2019. A longitudinal multimodal in vivo molecular imaging study of the 3xTg-AD mouse model shows progressive early hippocampal and taurine loss. Hum. Mol. Genet. https://doi.org/10.1093/hmg/ddz045.

Cirillo, C., Capoccia, E., Iuvone, T., Cuomo, R., Sarnelli, G., Steardo, L., Esposito, G., 2015. S100B inhibitor pentamidine attenuates reactive gliosis and reduces neuronal loss in a mouse model of Alzheimer's disease. Biomed Res. Int. https://doi.org/10.1155/2015/508342.

Clinton, L.K., Billings, L.M., Green, K.N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., McGaugh, J.L., LaFerla, F.M., 2007. Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. Neurobiol. Dis. 28, 76–82. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.06.013.

Cristóvaõ, J.S., Gomes, C.M., 2019. S100 proteins in alzheimer's disease. Front. Neurosci. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00463.

Dajas-Bailador, F., Bantounas, I., Jones, E.V., Whitmarsh, A.J., 2014. Regulation of axon growth by the JIP1-AKT axis. J. Cell Sci. https://doi.org/10.1242/jcs.137208.

Deleglise, B., Magnifico, S., Duplus, E., Vaur, P., Soubeyre, V., Belle, M., Vignes, M., Viovy, J.L., Jacotot, E., Peyrin, J.M., Brugg, B., 2014. β-amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. Acta Neuropathol. Commun. https://doi.org/10.1186/s40478-014-0145-3.

Dermietzel, R., Traub, O., Hwang, T.K., Beyer, E., Bennett, M.V.L., Spray, D.C., Willecke, K., 1989. Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.10148.

Díaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trias, E., Cragnolini, A., Martínez-Palma, L., Cassina, P., Beckman, J., Barbeito, L., 2011. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. https://doi.org/10.1073/pnas.1110689108.

Ekblom, J., Jossan, S.S., Bergström, M., Oreland, L., Walum, E., Aquilonius, S.M., 1993. Monoamine oxidase-B in astrocytes. Glia 8, 122–132. https://doi.org/10.1002/glia.440080208.

Fahnestock, M., Shekari, A., 2019. ProNGF and neurodegeneration in alzheimer's disease. Front. Neurosci. 13, 129. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00129.

Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K., 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137.

Frost, G.R., Li, Y.-M., 2017. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. Open Biol 7. https://doi.org/10.1098/rsob.170228.

Garaschuk, O., Verkhratsky, A., 2019. GABAergic astrocytes in Alzheimer's disease. Aging (Albany. NY). https://doi.org/10.18632/aging.101870.

Giaume, C., Theis, M., 2010. Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. Brain Res. Rev. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.005.

Gomes, C., Sequeira, C., Barbosa, M., Cunha, C., Vaz, A.R., Brites, D., 2020. Astrocyte regional diversity in ALS includes distinct aberrant phenotypes with common and causal pathological processes. Exp. Cell Res. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112209.

Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J.H., Petersen, R.C., Parisi, J.E., Hyman, B.T., 1997. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Ann. Neurol. https://doi.org/10.1002/ana.410410106.

González-Molina, L.A., Villar-Vesga, J., Henao-Restrepo, J., Villegas, A., Lopera, F., Cardona-Gómez, G.P., Posada-Duque, R., 2021. Extracellular vesicles from 3xTg-AD mouse and alzheimer's disease patient Astrocytes impair neuroglial and vascular components. Front. Aging Neurosci. 13, 593927 https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.593927.

González-Reyes, R.E., Nava-Mesa, M.O., Vargas-Sánchez, K., Ariza-Salamanca, D., Mora-Muñoz, L., 2017. Involvement of astrocytes in alzheimer's disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective. Front. Mol. Neurosci.

Gulyás, B., Pavlova, E., Kása, P., Gulya, K., Bakota, L., Várszegi, S., Keller, E., Horváth, M. C., Nag, S., Hermecz, I., Magyar, K., Halldin, C., 2011. Activated MAO-B in the brain of Alzheimer patients, demonstrated by [11C]-L-deprenyl using whole hemisphere autoradiography. Neurochem. Int. 58, 60–68. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.10.013.

Habib, N., McCabe, C., Medina, S., Varshavsky, M., Kitsberg, D., Dvir-Szternfeld, R., Green, G., Dionne, D., Nguyen, L., Marshall, J.L., Chen, F., Zhang, F., Kaplan, T., Regev, A., Schwartz, M., 2020. Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. Nat. Neurosci. https://doi.org/10.1038/s41593-020-0624-8.

Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science. https://doi.org/10.1126/science.1566067, 80-.

Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J. El, Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C.A., Breitner, J.C., Cole, G.M., Golenbock, D. T., Kummer, M.P., 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. Lancet Neurol. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5.

Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S., 2008. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. J. Neurochem. 104, 1433–1439. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x.

Huang, R.P., Fan, Y., Hossain, M.Z., Peng, A., Zeng, Z.L., Boynton, A.L., 1998. Reversion of the Neoplastic Phenotype of Human Glioblastoma Cells by Connexin 43 (Cx43). Cancer Res.

Iram, T., Trudler, D., Kain, D., Kanner, S., Galron, R., Vassar, R., Barzilai, A., Blinder, P., Fishelson, Z., Frenkel, D., 2016. Astrocytes from old Alzheimer's disease mice are impaired in Aβ uptake and in neuroprotection. Neurobiol. Dis. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.08.001.

Jackson, J., Jambrina, E., Li, J., Marston, H., Menzies, F., Phillips, K., Gilmour, G., 2019. Targeting the synapse in Alzheimer's disease. Front. Neurosci. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00735.

Jo, S., Yarishkin, O., Hwang, Y.J., Chun, Y.E., Park, M., Woo, D.H., Bae, J.Y., Kim, T., Lee, J., Chun, H., Park, H.J., Lee, D.Y., Hong, J., Kim, H.Y., Oh, S.J., Park, S.J., Lee, H., Yoon, B.E., Kim, Y., Jeong, Y., Shim, I., Bae, Y.C., Cho, J., Kowall, N.W., Ryu, H., Hwang, E., Kim, D., Lee, C.J., 2014. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. Nat. Med. https://doi.org/10.1038/nm.3639.

Jope, R.S., Mines, M.A., Beurel, E., 2011. Regulation of cell survival mechanisms in alzheimer's disease by glycogen synthase kinase-3. Int. J. Alzheimers. Dis. https://doi.org/10.4061/2011/861072.

Kamphuis, W., Middeldorp, J., Kooijman, L., Sluijs, J.A., Kooi, E.J., Moeton, M., Freriks, M., Mizee, M.R., Hol, E.M., 2014. Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.035.

Kettenmann, H., Ransom, B.R., 2013. Neuroglia, neuroglia. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195152227.001.0001.
Kielian, T., Esen, N., 2004. Effects of neuroinflammation on glia-glia gap junctional intercellular communication: a perspective. Neurochem. Int. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.09.010.
Kreimerman, I., Reyes, A.L., Paolino, A., Pardo, T., Porcal, W., Ibarra, M., Oliver, P., Savio, E., Engler, H., 2019. Biological assessment of a (18)F-labeled sulforhodamine 101 in a mouse model of alzheimer's disease as a potential astrocytosis marker. Front. Neurosci. 13, 734. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00734.
Kriaučiūnaitė, K., Kaušylė, A., Pajarskienė, J., Tunaitis, V., Lim, D., Verkhratsky, A., Pivoriūnas, A., 2021. Immortalised hippocampal astrocytes from 3xTG-AD mice fail to support BBB integrity in vitro: role of extracellular vesicles in glial-endothelial communication. Cell. Mol. Neurobiol. 41, 551–562. https://doi.org/10.1007/s10571-020-00871-w.
Kulijewicz-Nawrot, M., Verkhratsky, A., Chvátal, A., Syková, E., Rodríguez, J.J., 2012. Astrocytic cytoskeletal atrophy in the medial prefrontal cortex of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. J. Anat. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01536.x.
Leclerc, E., Sturchler, E., Vetter, S.W., 2010. The S100B/RAGE axis in alzheimer's disease. Cardiovasc. Psychiatry Neurol. https://doi.org/10.1155/2010/539581.
Liddelow, S.A., Barres, B.A., 2017. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. Immunity. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006.
Liddelow, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.S., Peterson, T.C., Wilton, D.K., Frouin, A., Napier, B.A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M.S., Rowitch, D.H., Dawson, V. L., Dawson, T.M., Stevens, B., Barres, B.A., 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature. https://doi.org/10.1038/nature21029.
Liu, P.-P., Xie, Y., Meng, X.-Y., Kang, J.-S., 2019. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. Signal Transduct. Target. Ther. https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8.
Loreto, A., Hill, C.S., Hewitt, V.L., Orsomando, G., Angeletti, C., Gilley, J., Lucci, C., Sanchez-Martinez, A., Whitworth, A.J., Conforti, L., Dajas-Bailador, F., Coleman, M. P., 2020. Mitochondrial impairment activates the Wallerian pathway through depletion of NMNAT2 leading to SARM1-dependent axon degeneration. Neurobiol. Dis. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104678.
Lucas, J.J., Hernández, F., Gómez-Ramos, P., Morán, M.A., Hen, R., Avila, J., 2001. Decreased nuclear β-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3β conditional transgenic mice. EMBO J. https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.27.
Lucci, C., Mesquita-Ribeiro, R., Rathbone, A., Dajas-Bailador, F., 2020. Spatiotemporal regulation of GSK3β levels by miRNA-26a controls axon development in cortical neurons. Dev. https://doi.org/10.1242/dev.180232.
Markesbery, W.R., 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. Free Radic. Biol. Med. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00629-6.
Marshak, D.R., Pesce, S.A., Stanley, L.C., Griffin, W.S.T., 1992. Increased S100β neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. Neurobiol. Aging. https://doi.org/10.1016/0197-4580(92)90002-F.
Marutle, A., Gillberg, P.-G., Bergfors, A., Yu, W., Ni, R., Nennesmo, I., Voytenko, L., Nordberg, A., 2013. ^{3}H-deprenyl and ^{3}H-PIB autoradiography show different laminar distributions of astroglia and fibrillar β-amyloid in Alzheimer brain. J. Neuroinflammation 10, 90. https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-90.
Mullane, K., Williams, M., 2019. Preclinical models of alzheimer's disease: relevance and translational validity. Curr. Protoc. Pharmacol. https://doi.org/10.1002/cpph.57.
Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., LaFerla, F.M., 2003. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. In: Neurobiology of Aging. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.012.
Olabarria, M., Noristani, H.N., Verkhratsky, A., Rodríguez, J.J., 2010. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. Glia. https://doi.org/10.1002/glia.20967.
Orellana, E., Kasinski, A., 2016. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. BIO-PROTOCOL. https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1984.
Pap, M., Cooper, G.M., 1998. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3- kinase/Akt cell survival pathway. J. Biol. Chem. https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.19929.
Perez-Nievas, B.G., Serrano-Pozo, A., 2018. Deciphering the astrocyte reaction in Alzheimer's disease. Front. Aging Neurosci. https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00114.
Rodriguez-Vieitez, E., Saint-Aubert, L., Carter, S.F., Almkvist, O., Farid, K., Schöll, M., Chiotis, K., Thordardottir, S., Graff, C., Wall, A., Långström, B., Nordberg, A., 2016. Diverging longitudinal changes in astrocytosis and amyloid PET in autosomal dominant Alzheimer's disease. Brain 139, 922–936. https://doi.org/10.1093/brain/awv404.
Rouach, N., Avignone, E., Même, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F., Giaume, C., 2002. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. Biol. Cell. https://doi.org/10.1016/S0248-4900(02)00016-3.
Sáez, E.T., Pehar, M., Vargas, M.R., Barbeito, L., Maccioni, R.B., 2006. Production of nerve growth factor by β-amyloid-stimulated astrocytes induces p75NTR-dependent tau hyperphosphorylation in cultured hippocampal neurons. J. Neurosci. Res. https://doi.org/10.1002/jnr.20996.
Santello, M., Toni, N., Volterra, A., 2019. Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. Nat. Neurosci. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0325-8.
Saper, C.B., Wainer, B.H., German, D.C., 1987. Axonal and transneuronal transport in the transmission of neurological disease: potential role in system degenerations, including alzheimer's disease. Neuroscience. https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90063-7.
Sasaki, Y., Vohra, B.P.S., Lund, F.E., Milbrandt, J., 2009. Nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase-mediated axonal protection requires enzymatic activity but not increased levels of neuronal nicotinamide adenine dinucleotide. J. Neurosci. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5469-08.2009.
Saura, J., Luque, J.M., Cesura, A.M., Da Prada, M., Chan-Palay, V., Huber, G., Löffler, J., Richards, J.G., 1994. Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography. Neuroscience 62, 15–30. https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90311-5.
Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089.
Seira, O., Del Río, J.A., 2014. Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3β) at the tip of neuronal development and regeneration. Mol. Neurobiol. https://doi.org/10.1007/s12035-013-8571-y.
Selkoe, D.J., 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. Science. https://doi.org/10.1126/science.1074069, 80-.
Selkoe, D.J., Hardy, J., 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Mol. Med. https://doi.org/10.15252/emmm.201606210.
Siracusa, R., Fusco, R., Cuzzocrea, S., 2019. Astrocytes: role and functions in brain pathologies. Front. Pharmacol. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01114.
Sofroniew, M.V., 2020. Astrocyte reactivity: subtypes, states, and functions in CNS innate immunity. Trends Immunol. https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.004.
Sofroniew, M.V., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. Trends Neurosci. https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002.
Stenovec, M., Trkov, S., Lasič, E., Terzieva, S., Kreft, M., Rodríguez Arellano, J.J., Parpura, V., Verkhratsky, A., Zorec, R., 2016. Expression of familial Alzheimer disease presenilin 1 gene attenuates vesicle traffic and reduces peptide secretion in cultured astrocytes devoid of pathologic tissue environment. Glia 64, 317–329. https://doi.org/10.1002/glia.22931.
Sycheva, M., Sustarich, J., Zhang, Y., Selvaraju, V., Geetha, T., Gearing, M., Babu, J.R., 2019. Pro-nerve growth factor induces activation of RhoA kinase and neuronal cell death. Brain Sci 9. https://doi.org/10.3390/brainsci9080204.
Tatsumi, K., Isonishi, A., Yamasaki, M., Kawabe, Y., Morita-Takemura, S., Nakahara, K., Terada, Y., Shinjo, T., Okuda, H., Tanaka, T., Wanaka, A., 2018. Olig 2-Lineage astrocytes: a distinct subtype of astrocytes that differs from GFAP astrocytes. Front. Neuroanat. https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00008.
Taylor, A.M., Blurton-Jones, M., Rhee, S.W., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., Jeon, N.L., 2005. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. Nat. Methods. https://doi.org/10.1038/nmeth777.
Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R., 1991. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. Ann. Neurol. https://doi.org/10.1002/ana.410300410.
Verkhratsky, A., Nedergaard, M., 2018. Physiology of astroglia. Physiol. Rev. https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016.
Villarreal, A., Rosciszewski, G., Murta, V., Cadena, V., Usach, V., Dodes-Traian, M.M., Setton-Avruj, P., Barbeito, L.H., Ramos, A.J., 2016. Isolation and characterization of ischemia-derived astrocytes (IDAs) with ability to transactivate quiescent astrocytes. Front. Cell. Neurosci. https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00139.
Vogel, J.W., Iturria-Medina, Y., Strandberg, O.T., Smith, R., Levitis, E., Evans, A.C., Hansson, O., 2020. Spread of pathological tau proteins through communicating neurons in human Alzheimer's disease. Nat. Commun. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15701-2.
Walker, C.A., Randolph, L.K., Matute, C., Alberdi, E., Baleriola, J., Hengst, U., 2018. Aβ 1–42 triggers the generation of a retrograde signaling complex from sentinel mRNA s in axons. EMBO Rep. https://doi.org/10.15252/embr.201745435.
Wang, R., Reddy, P.H., 2017. Role of glutamate and NMDA receptors in alzheimer's disease. J. Alzheimer's Dis. https://doi.org/10.3233/JAD-160763.
Yasuda, Y., Tateishi, N., Shimoda, T., Satoh, S., Ogitani, E., Fujita, S., 2004. Relationship between S100β and GFAP expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after mild transient ischemia. Brain Res. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.06.015.
Yeh, C.W., Yeh, S.H.H., Shie, F.S., Lai, W.S., Liu, H.K., Tzeng, T.T., Tsay, H.J., Shiao, Y.J., 2015. Impaired cognition and cerebral glucose regulation are associated with astrocyte activation in the parenchyma of metabolically stressed APPswe/PS1dE9 mice. Neurobiol. Aging. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.07.022.
Zhu, D., Elisevich, K., Maestro, R.F.D., Belliveau, D.J., 1992. In: Vivo Growth of C6 Glioma Cells Transfected with Connexin 43 cDNA. Cancer Res.
Zlokovic, B.V., 2005. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. Trends Neurosci. https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.02.001.

1.2. Publicación efecto neuroprotetor de flavanonas preniladas: "*Neuroprotective effects of prenylated flavanones isolated from Dalea species, in vitro and in silico studies*", Santi MD, Arredondo F, Carvalho D, Echeverry C, Prunell G, Peralta MA, Cabrera JL, Ortega MG, Savio E, Abin Carriquiry JA. European Journal of Medicinal Chemistry 206 (2020).
Doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112718

European Journal of Medicinal Chemistry 206 (2020) 112718

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ejmech

Research paper

Neuroprotective effects of prenylated flavanones isolated from *Dalea* species, *in vitro* and *in silico* studies

María D. Santi [b, d], Florencia Arredondo [c, d, *], Diego Carvalho [c], Carolina Echeverry [c], Giselle Prunell [c], Mariana A. Peralta [a, b], José L. Cabrera [b], María G. Ortega [a, b], Eduardo Savio [d], Juan A. Abin-Carriquiry [c, e, **]

[a] Farmacognosia, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Haya de La Torre y Medina Allende, Edificio Ciencias II, Córdoba, Argentina
[b] Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET), Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina
[c] Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay
[d] I&D Biomédico y Químico Farmacéutico, Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), Montevideo, Uruguay
[e] Laboratorio de Biofármacos, Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 June 2020
Received in revised form
31 July 2020
Accepted 2 August 2020
Available online 12 August 2020

Keywords:
Prenylated flavanones
Dalea elegans
Dalea pazensis
Neuroprotection

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases (NDs) represent a global problem on public health, with a growing incidence as human longevity increases. Currently, although there are palliative strategies available for most of these diseases, there is a lack of effective therapies for their cure. Flavonoids are extensively studied for their multi-target behavior. Among numerous biological activities, it has been reported that they act at the CNS level, presenting neuroprotective activity through different mechanisms of action. *Dalea* L. (Fabaceae) is an American genus, with about 172 species. *Dalea elegans* Gillies ex. Hook. & Arn and *Dalea pazensis* Rusby, both South American species, are the important source of natural compounds of the prenylated flavanones type.

In the present study, five prenylated flavanones isolated from *Dalea* species were assayed for their neuroprotective activity in two *in vitro* models of neurodegeneration. Flavanones 1 and 2 exhibited neuroprotective effects against oxidative stress-induced death in both models, granular cerebellar neurons and (NGF)-differentiated PC12 cells. Structure-activity relationships were also reported. Our results indicated that an 8-prenyl group at the A-ring accompanied by an unsubstituted B-ring, or a 2′,4′-dihydroxy-5′-dimethylallyl substitution, lead to the most potent flavanones. Furthermore, *in silico* studies were performed, and several putative targets in NDs were identified for compounds 1 and 2. Between them, the enzyme acetylcholinesterase was selected for its validation *in vitro*. The present *in vitro* and *in silico* results imply that prenylated flavanones 1 and 2 may be useful in the development and design of future strategies for the treatment of NDs diseases.

© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

An increase in life expectancy in the last century leads to an exponential enhance of the prevalence and incidence of age-related disorders such as neurodegenerative diseases (NDs) as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), amyotrophic lateral sclerosis, among others [1–7]. Although each NDs has a unique and complex etiology that is not fully understood, the progressive loss of neuronal populations is a common factor between them [1–4,8,9]. The main events proposed to trigger neurodegeneration are: oxidative stress, excitotoxicity, neuroinflammation, alterations in metabolic processes, mitochondrial dysfunction, protein aggregation, and changes in the metabolism of Fe^{2+} and Ca^{2+}. In addition, environmental factors, such as pesticide exposure were reported [3,4,9].

The current pharmacological treatments are directed to the symptomatic control and not to halt or slow the process of neuronal

* Corresponding author. I&D Biomédico y Químico Farmacéutico, Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), Montevideo, Uruguay.
** Corresponding author. Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay.
E-mail addresses: florencia.arredondo@cudim.org (F. Arredondo), jaabin@iibce.edu.uy (J.A. Abin-Carriquiry).

https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112718
0223-5234/© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

degeneration. Besides, they are effective for a limited period and have numerous adverse effects [5,10–13]. In this sense, there is a growing interest in the search for leading compounds as neuroprotective agents.

Flavonoids are one of the most diverse groups of polyphenols studied, and multiple evidence indicates that these compounds have several targets on the central nervous system (CNS) and might prevent or slow the neuronal damage underlying neurodegenerative disorders and thus retarding the progression of these diseases [1,2,4,12,14–20]. Previously, we informed the isolation, purification, identification, and different biological activities of two prenylated flavanones obtained from roots and aerial parts of the Argentinian species *Dalea elegans* Gillies ex Hook & Arn [21–28]. Also, we have initiated chemical and pharmacological studies on the Bolivian species *Dalea pazensis* Rusby, which presents ethnopharmacological reported uses in traditional medicine and as animal food by the Quechua community in Apillapampa, Bolivia [29]. Four natural prenylated flavanones were isolated from the roots of that species [30]. According to our knowledge, there is nearly no report about their bioactivity on neurodegenerative diseases.

In this work we evaluated the neuroprotective potential of five natural prenylated flavanones: *(−)-(2S)-2′,4′-dihydroxy-5′-(1‴,1‴-dimethylallyl)-8-prenylpinocembrin* (8 PP, **1**), *(−)-(2S)-8-prenylpinocembrin* (glabranin, **2**), *(−)-(2S)-4′-hydroxy-2′-methoxy-5′-(1‴,1‴-dimethylallyl)-8-prenylpinocembrin* (Me8PP, **3**), *(−)-(2S)-3′,4′-dihydroxy-6,2′-diprenylpinocembrin* (pazentin A, **4**) and, *(2S)-(−)-4′-hydroxy-2′-methoxy-5′-(1‴,1‴-dimethylallyl)-6-prenylpinocembrin* (pazentin B, **5**) in an *in vitro* degenerative model of a primary cerebellar granule neurons culture (CGN) [14]. With the aim to determinate structure-activity relationships (SARs), we have incorporated the flavanone pinocembrin (P, **6**) that contains a structural core common to all other flavanones. The most potent natural compounds were also tested in a neuronal differentiated PC12 cell line (PC12d) [31–33]. In both models, we evaluated the protective effects of prenylated flavanones against oxidative stress-induced death.

In addition, we have conducted a virtual screening for the most potent compounds (**1** and **2**), searching for NDs-related protein targets for those flavanones, based on ligand similarity search, pharmacophore comparison, and inverse docking [34]. As proof of concept, inhibition of the putative target acetylcholinesterase (AChE) was subsequently evaluated for these compounds.

2. Results and discussion

2.1. Flavanone toxicity and protective effects against H_2O_2 after CGN 24 h pre-treatment

It is known that reactive oxygen species (ROS) are associated with mitochondrial dysfunction and neuronal death. In this study, we evaluated the neuroprotective potential of each flavanone (**1**–**6**) (Fig. 1) in an H_2O_2 neuronal-induced death model.

For the assessment of flavanones **1** to **6** neuroprotection against oxidative insult, we incubated primary CGN cultures with each compound 24 h before H_2O_2 treatment. We also studied their toxic effect *per se* after 48 h treatment. Table 1 summarizes the LC_{50} and the EC (effective concentration), together with the respective percentage of neuroprotection for each compound.

The neuroprotective profiles of each flavanone are shown in Fig. 2. CGN pretreatments with **1**, **2**, and **3** attenuated oxidant-induced neuronal death, being **1** and **2** the most potent of the series. Interestingly, both molecules showed a biphasic dose-effect curve, at concentrations lower than 5 and 10 μM, respectively, did not prevent oxidant-induced neuronal death, and higher concentrations were toxic *per se*. On the other hand, flavanone **3** showed a dose-dependent effect, with effective concentrations starting from 50 μM, while it did not show toxic effects *per se*.

Regarding their molecular structures, all compounds share a 5,7-dihydroxy A ring-substitution pattern, that was reported as important for neuroprotective activity in different neurodegenerative diseases models, given their importance for conferring anti-apoptotic activity on flavonoids [20,35–37]. However, another feature of the structure must cause the differences in neuroprotective activity found in our experiments. According to previously informed by Dong et al. (2009), an 8-prenyl substituent at A ring and, a 2′,4′-dihydroxy substitution at B-ring lead to increase the neuroprotective activity in oxygen-glucose deprivation (OGD) induced PC12 cell injury model [36]. Both structural features are present in compound **1**, which exerts the most potent protective activity. Compounds **2** and **3**, possess the prenylated substituent in the C8 position of A ring, but they have a different substitution pattern at B rings. Those structural differences could explain the decrease in neuroprotective potency concerning compound **1**. Besides, it is interesting to mention that, if we compare **1** and **3**, the substitution of the hydroxyl group in C 2′ position of the B-ring for a methoxy group results in a decrease in both protective potency and toxicity *per se*. Finally, compounds **4**, **5**, and **6**, which lack these structural features, did not show a neuroprotective effect. That fact is also clearly seen when we compare **3** and **5**. Those compounds differ with respect to the position of the prenylated substituent (C8 and C6, respectively), which affects neuroprotective potency, resulting in compound **5** to be inactive.

Confocal fluorescence micrographs in Fig. 3 showed morphological features of cultures exposed to H_2O_2 and the effect of flavanones **1** and **2** pretreatments. In accordance with MTT results, the morphological characteristics of the cultures also suggested a neuroprotective effect of these compounds on CGN cells. Control (vehicle-treated only) cells (image A) showed intact nuclei and a complex neurite network. In contrast, vehicle-treated cells injured with H_2O_2 for 24 h (image B) looked degenerated, with condensed nuclei and fragmented neurites. However, in flavanone-treated cultures, there were less evident morphological alterations after H_2O_2 injury (images C and D) compared with vehicle treatment, indicating that the pretreatment with flavanones **1** and **2** better preserved neuronal integrity after 24 h of the oxidative insult.

2.2. Evaluation of flavanone cytotoxicity and cytoprotective effect against H_2O_2 injury in (NGF)-differentiated PC12 cell line

We pursued the study with compounds **1** and **2**, as the most potent flavanones in the CGN model, and evaluated their toxicity *per se* and cytoprotective potential in PC12d cells injured by H_2O_2. LC_{50} value for flavanone **1** was (13.0 ± 1.8) μM and LC_{50} for **2** was (27.3 ± 1.7) μM.

Flavanone **1** significantly prevented H_2O_2-induced cell death after 24 h, resulting in a % cytoprotection value of 51.76% at 0.5 μM, while flavanone **2** showed a % cytoprotection value of 31.32% at the same concentration. Therefore, compound **1** showed to be near two-fold more efficient than compound **2** in this paradigm (Fig. 4). The B ring substitution pattern of compound **1** seems to determine the potential differences between both compounds, being critical for its protective activity in this H_2O_2 induced-death model. These results are in accordance with Dong et al. (2009), which have observed that compound Leachianone G (2′,4′-dihydroxy-8-prenylpinocembrin) was the most neuroprotective comparing to other flavanones with different number and positions of hydroxy substituents at the B ring [36].

Our results showed that compounds **1** and **2** presented high potency and efficiency in the PC12d model vs CGN model. The differences observed in both models could be explained based on

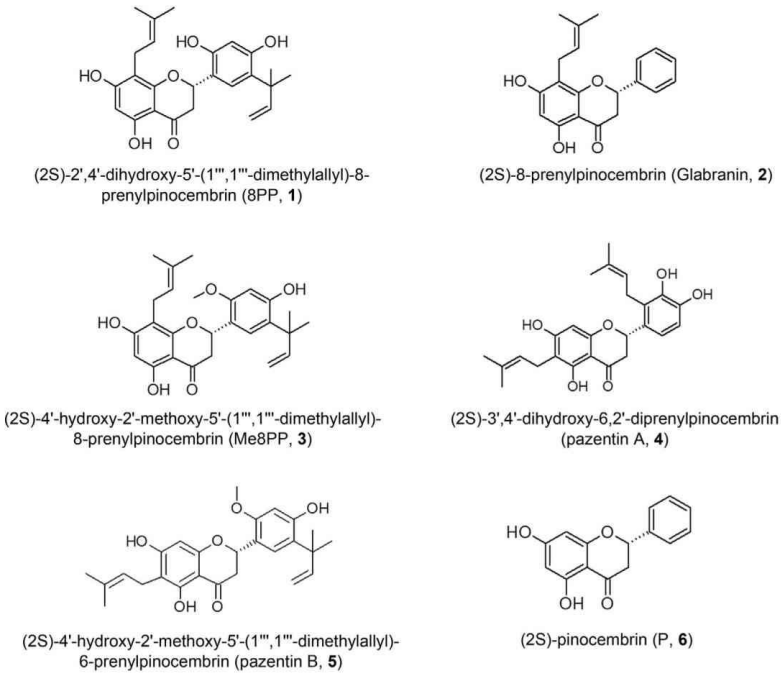


Fig. 1. Chemical structures of flavanones isolated from roots and aerial parts of *Dalea elegans* (**1** and **2** respectively), from roots of *Dalea pazensis* (**3**–**5**), and commercial flavanone Pinocembrin (**6**).

Table 1
LC_{50} (lethal concentration means), EC (effective concentration) and maximum percentage of neuroprotection of compounds **1**–**6** on CGN.

Flavanone	LC_{50} (μM)	EC (μM)	% CGN neuroprotection
1	(12.5 ± 3.9)	5	16.37
2	(44.5 ± 1.2)	10	20.34
3	>300	200	22.30
4	>300	–	–
5	(40.7 ± 0.6)	–	–
6	(247.4 ± 3.3)	–	–

the fact that there could be interactions between the flavonoids and the albumin present in fetal bovine serum in the primary CGN culture, as was previously informed [38–40]. In this sense, given the absence of serum in the PC12d cultures, we could hypothesize that the protection percentages obtained in this model, are closer to the true potency and efficacy of the tested compounds.

2.3. In silico studies

In order to go deeper into the therapeutic potential of flavanones **1** and **2** for preventing or treating NDs, we employed bioinformatics and searched for putative molecular targets of interest in neuropathology. Reverse screening of potential protein targets disclosed a wide array of candidates including protein kinases, hydrolases, Poly [ADP-ribose] polymerases, and receptor proteins. A subset of putative targets related to neurodegenerative diseases is presented in Table 2. Kinase inhibition by flavonoids is a well-known phenomenon that is also supported by the present results [41,42]. Beyond these ubiquitous targets, more novel targets can be highlighted, such as Beta-secretase-1 (BACE1), Catechol-O-methyltransferase (COMT), and Acetylcholinesterase (AChE). BACE1 participates in the synthesis of amyloid-β peptides and has been linked to axonal pathology in Alzheimer's diseases [43]. COMT is involved in the methylation of catecholamines. Inhibitors of that enzyme, are frequently used as co-therapy in Parkinson's disease [44]. AChE has a role in the synaptic transmission, where it degrades acetylcholine and other neurotransmitters [45]. Reversible AChE inhibitors such as rivastigmine, donepezil, and galantamine, are being employed in Alzheimer's disease patients, though not as a cure, to treat cognitive symptoms related to the early stages of pathology [45].

As an interesting putative molecular target of these flavanones, binding to AChE was further assessed by molecular docking with *AutoDock Vina* in an ensemble of crystal structures. Fig. 5 depicts the two main binding modes that could be identified among top ranking poses in most of the crystal structures. These correspond to the peripheral and catalytic sites previously described for the enzyme [46,47].

Furthermore, Fig. 6 showed that the prenylated flavanone **2** more clearly reaches the bottom of the catalytic site, which could be related to the difference in activity to flavanone **1**. The flavanones are able to interact mainly by π-π interactions with residues Tyr 341 at the B ring and Trp 286/Trp 86 at the A ring. In particular unsubstituted B ring of flavone **2** contacts aromatic residues Phe 338 and Tyr 337 which could be seen as an aromatic cage at the entrance of the site. Additional hydrogen bonds can be established with the protein backbone and flavanone's C ring carbonyl at residues Gly 120 (**2**) and Phe 295 (**1**) (see Supplementary material).

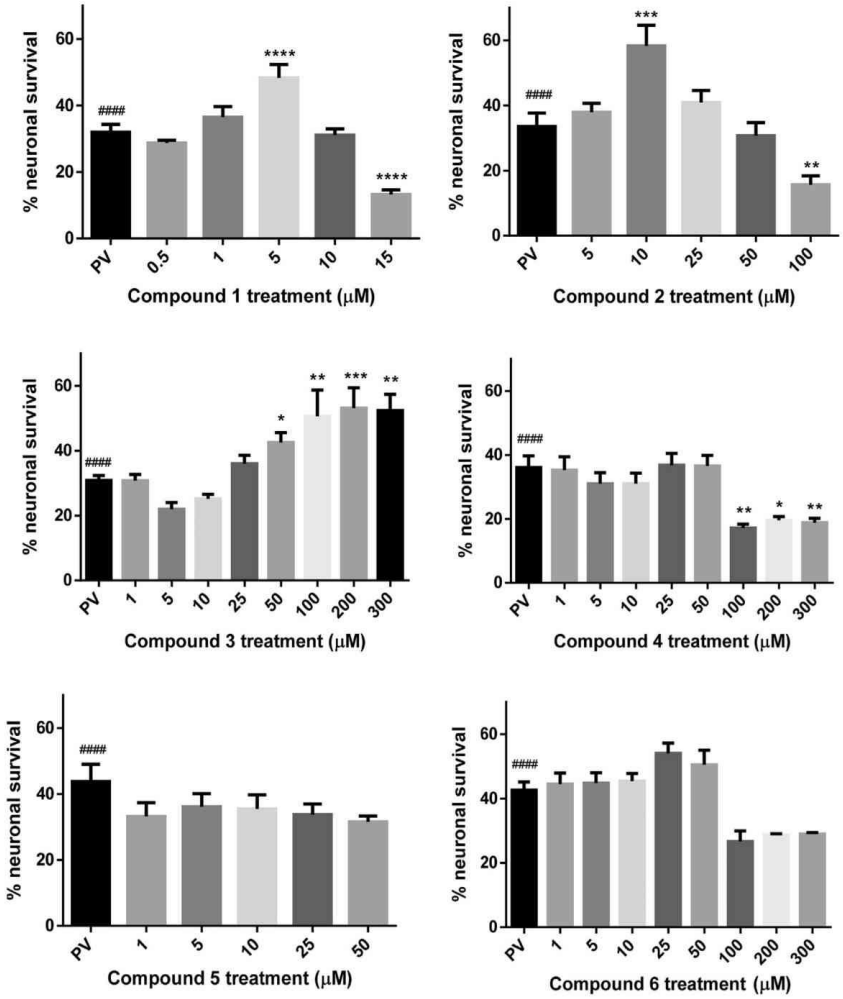


Fig. 2. Neuronal survival of CGN cells treated with different prenylated flavanones, before H_2O_2 induced-death # Statistically different with respect to vehicle control (CV). * Statistically different with respect to control after injury with H_2O_2 (PV). The results were analyzed by unidirectional ANOVA followed by the Bonferroni's test for multiple comparisons using *GraphPad Prism 6* software.

Other possible interactions involve hydrogen bonds with O epoxy at flavanone C ring and aromatic residues Tyr 337 and Tyr 124 in the case of compound **2**, and aromatic residue Tyr 124 in the case of **1** (see Supplementary material), as well as interaction between Trp86 carbonyl backbone and OH group at C7 of A ring of **2**. Most of the described interactions can also be seen in the known inhibitors present in the reference structures such as Donepezil (4ey7), Huperzine A (4ey5), and Territrem B (4m0f) among others.

2.4. In vitro validation of acetylcholinesterase inhibition, as a putative molecular target of prenylated flavanones

AChE is an important target related to the pathogenesis of NDs diseases. It has been extensively reported that AChE inhibitors are effective in the treatment of cognitive impairment in patients with PD, as well as, to decrease dementia and, visual hallucinations. For example, rivastigmine, an AChE inhibitor drug is used to treat dementia in PD [50–54]. For the AD disease, AChE inhibitors compensate for the death of cholinergic neurons and offer a symptomatic relief [55–57]. In this way, new inhibitors of this target such as the presented flavonoids would be important for NDs treatment.

In order to validate the results obtained *in silico*, we analyzed inhibitory activity of compounds **1** and **2** on human AChE (Fig. 7A–B). The IC_{50} values were estimated using *GraphPad Prism* 6. For compound **1**, the IC_{50} value was of (28.98 ± 1.14) μM and, for compound **2** was of (0.0064 ± 0.0012) μM. In addition, if we compare with the positive control used in this study, physostigmine

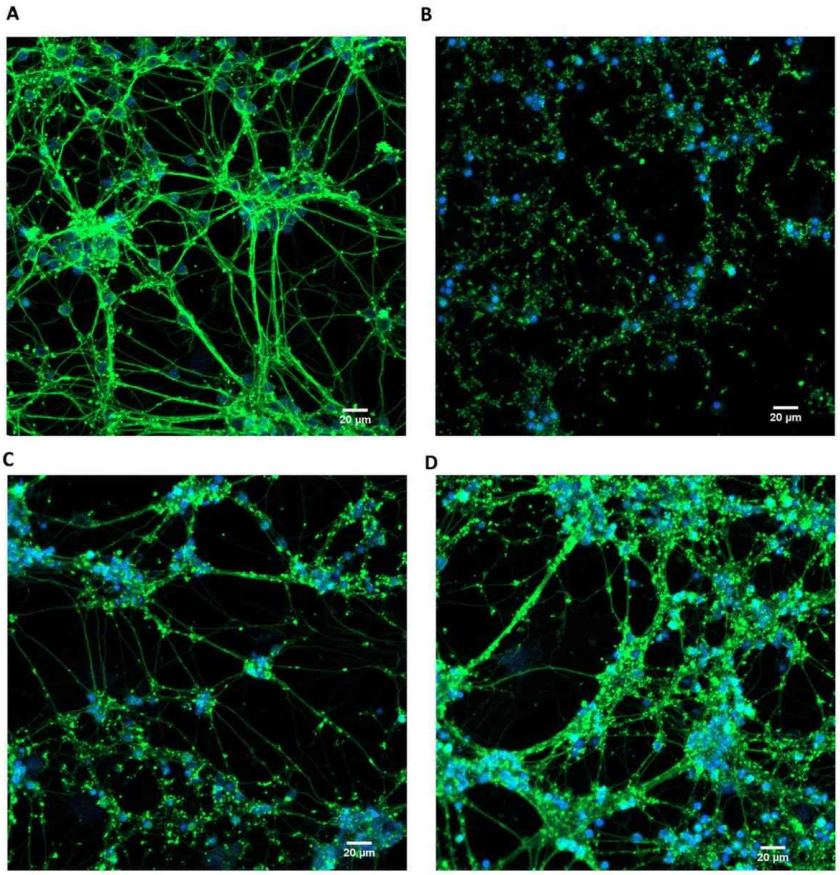


Fig. 3. Immunocytochemistry images of CGN cells. A) Control cells; B) Cells treated for 24 h with hydrogen peroxide (140 µM); C) Cells pre-treated with compound 1 or D) compound 2 respectively, followed for damage with hydrogen peroxide (140 µM) for 24 h. All images show nuclei stained with Hoechst 33258 dye (blue fluorescence), and the neuronal integrity with the cytoskeleton marker anti-α-Tubulin (green fluorescence). The images were obtained at 20X. Scale bar 20 µM. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

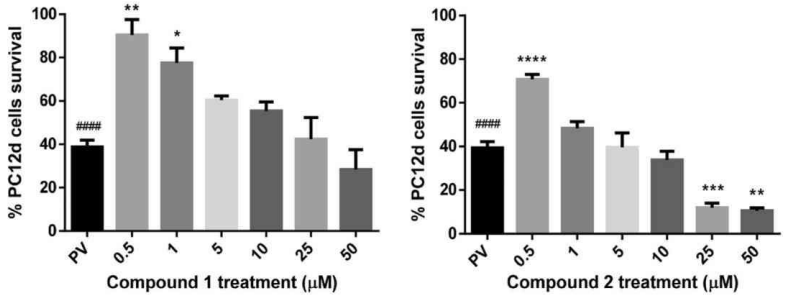


Fig. 4. Cellular survival of PC12d cells pretreated with flavanone **1** or **2**, and exposed to H_2O_2 induced-death (50–70%). # Statistically different with respect to vehicle control (CV). * Statistically different with respect to control after H_2O_2 induced-death (PV). The results were analyzed by unidirectional ANOVA followed by the Bonferroni's test for multiple comparisons using *GraphPad Prism 6* software.

Table 2
Protein neurodegenerative diseases target candidates for compounds **1** and **2**. Candidate proteins were depicted according to the corresponding Uniprot entry (human homolog in parenthesis), name, PDB class, and to biological process relevant to diseases progression. The information was gathered from publicly available databases like PDB, Uniprot and gene ontology repositories.

Uniprot id	Name	Reference	Biological process	Class	1	2
Q00534	Cyclin-dependent kinase 6	PMID: 25689470	–	Transferase		X
P29597	Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2	PMID: 20484629	Innate immune response	Transferase		X
P68400	Casein kinase II subunit alpha	PMID: 28067771	Apoptosis	Transferase	X	X
P16083	NRH:quinone oxidoreductase 2	PMID: 18314446	-	Oxidoreductase		X
P11309	Serine/threonine-protein kinase pim-1	PMID: 27412291	Apoptosis	Transferase	X	X
P24941	Cyclin-dependent kinase 2	PMID: 15350897	Cell cycle/cell division/cell proliferation	Transferase	X	X
Q16539	Mitogen-activated protein kinase 14	PMID: 30473884	Apoptosis	Transferase	X	X
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	PMID: 31600883		Chaperone	X	X
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	PMID: 25881554	Positive regulation of neuron death	Transferase	X	X
P23458	Tyrosine-protein kinase JAK1	PMID: 27147665	Innate immune response	Transferase		X
P00797	Renin	PMID: 28836869		Hydrolase		X
Q9UGN5	Poly [ADP-ribose] polymerase 2	PMID: 24874851		Transferase		X
P01112	GTPase Hras	PMID: 24926233	Cell cycle/cell division/cell proliferation	Signaling protein		X
Q08499	cAMP-specific 3′,5′-cyclic phosphodiesterase 4D	PMID: 28062949	Signal transduction	Hydrolase	X	X
Q86WV6	Stimulator of interferon genes protein	Patent: wo2017096963 a1	Apoptosis	Immune system	X	X
Q07343	cAMP-specific 3′,5′-cyclic phosphodiesterase 4B	PMID: 28062949		Hydrolase	X	X
Q03181	Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR-delta)	PMID: 23500098	Apoptosis	Transcription		X
P28482	Mitogen-activated protein kinase 1 (ERK-2)	PMID: 20079433	Apoptosis	Transferase	X	X
P53355	Death-associated protein kinase 1	PMID: 31248062	Apoptosis	Transferase		X
P11802	Cyclin-dependent kinase 4	PMID: 15350897	Cell cycle/cell division/cell proliferation	Cell cycle		X
O60674	Tyrosine-protein kinase JAK2	PMID: 27048338	Apoptosis	Transferase		X
P37231	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma)	PMID: 23469878	Innate immune response	Receptor	X	X
P19793	Retinoic acid receptor RXR-alpha	PMID: 19457078		Transcription		X
P48736	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform	PMID: 29515352	Innate immune response	Phosphoinositide 3-kinase gamma		X
P56817	Beta-secretase-1	PMID: 24081378		Hydrolase	X	X
O15530	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	PMID: 24013743	Cellular response to insulin stimulus	Transferase	X	X
Q9Y233	cAMP and cAMP-inhibited cGMP 3′,5′-cyclic phosphodiesterase 10A	PMID: 29508924	Signal transduction	Hydrolase	X	
O96013	Serine/threonine-protein kinase PAK 4	PMID: 23162743	Signal transduction	Transferase	X	
P35558	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic	PMID: 21152065		Lyase	X	
Q13464	Rho-associated protein kinase 1	PMID: 31578315	Signal transduction	Transferase	X	
P00519	Tyrosine-protein kinase ABL1	PMID: 21728062	Positive regulation of neuron death	Transferase	X	
P49841	Glycogen synthase kinase-3 beta	PMID: 25829335	Positive regulation of neuron death	Transferase	X	
Q15119	Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2	PMID: 22321732		Transferase	X	
Q5TCY1	Tau-tubulin kinase 1	PMID: 23088643		Transferase	X	
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	PMID: 29764935		Protein binding	X	
Q13976	cGMP-dependent protein kinase 1	PMID: 19241460	Signal transduction	Transferase	X	
P21836 (P22303)	**Acetylcholinesterase**	**PMID: 25224676**		**Hydrolase**	X	X
Q9CPU0 (Q04760)	Lactoylglutathione lyase	PMID: 21248374		Lyase	X	X
P05132 (P17612)	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	PMID: 23430246		Transferase	X	X
P00520 (P00519)	Tyrosine-protein kinase ABL1	PMID: 21728062	Positive regulation of neuron death	Transferase	X	
Q63226 (O43424)	Glutamate receptor ionotropic, delta-2	PMID: 31500132		Signaling protein		X
P19491 (P42262)	Glutamate receptor 2	PMID: 31500132		Membrane protein	X	X
Q9QYJ6 (Q9Y233)	cAMP and cAMP-inhibited cGMP 3′,5′-cyclic phosphodiesterase 10A	PMID: 29508924		Hydrolase	X	
P22756 (P39086)	Glutamate receptor ionotropic, kainate 1 (Glutamate receptor 5)	PMID: 31500132		Membrane protein	X	
P22734 (P21964)	Catechol-O-methyltransferase	PMID: 25559423		Transferase	X	
P13491 (P00338)	L-lactate dehydrogenase A	PMID: 26316984		Oxidoreductase	X	
P00592 (P04054)	Phospholipase A2	PMID: 20553961		Hydrolase		X
P00517 (P17612)	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	PMID: 23430246		Transferase	X	X

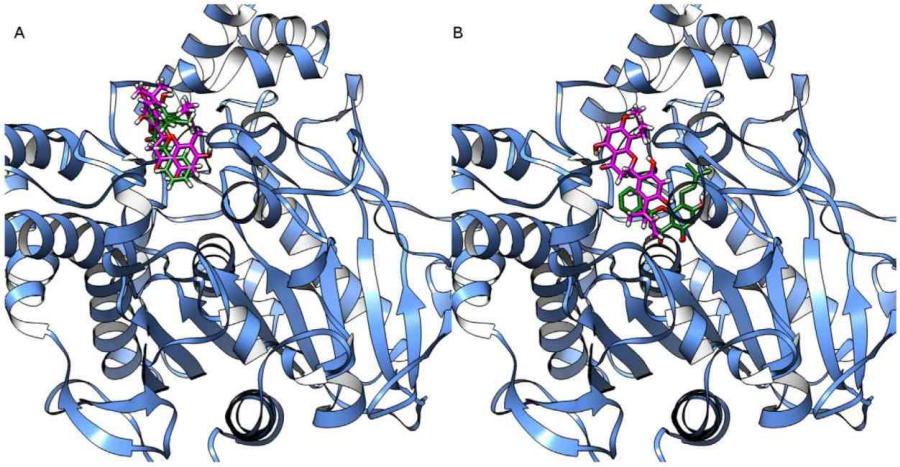


Fig. 5. Binding modes of the prenylated flavanones on human AChE. Poses A span the peripheral binding site, while Poses B enter the catalytic pocket. **1** colored in pink, **2** colored in green, Image rendered in UCFS chimera software [48]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

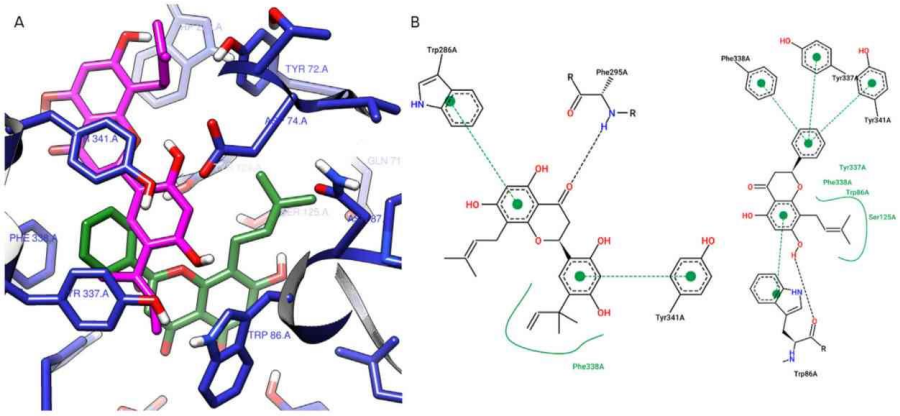


Fig. 6. Binding mode of the prenylated flavanones on human AChE that reach the catalytic site. Sector A depicts the tridimensional orientation at the binding site, **1** colored in pink, and **2** colored in green, protein residues and backbone colored in blue. Sector B depicts contact information of the same poses. Images rendered in UCFS chimera software [48] and ProteinsPlus [49] web server. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

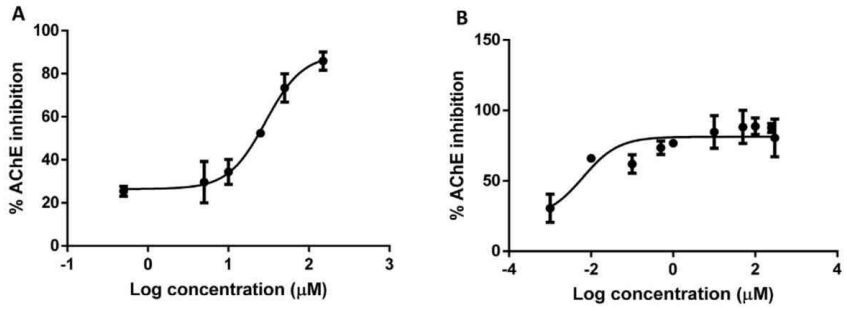


Fig. 7. Human AChE inhibition profiles vs log concentration of *D. elegans* and *D. pazensis* prenylated flavanones. A) Compound **1**, B) Compound **2**.

[IC_{50}, (0.08 ± 1.14) μM], compound **2** was approximately 12-fold more potent than that reference inhibitor. On the other hand, it can be observed that compound **2** showed to be approximately 4500-fold more active than compound **1**.

These pharmacological differences between natural compounds, could be explained in part by molecular docking results, in that flavanone inhibitory activity could arise from the different region occupied by each one at AChE binding site, being **2** located at the bottom of the catalytic site. This feature probably emerges from **2** unsubstituted B ring that enables the molecule to be locked by an aromatic triad of residues Tyr 337, Phe 338, and Tyr 341.

3. Conclusions

Dalea elegans Gillies ex. Hook. & Arn and *Dalea pazensis* Rusby have been studied for being a vast source of prenylated flavanones, with important demonstrated pharmacological activities. In the present work, two flavanone compounds isolated from roots and aerial parts of these *Dalea* species were the most potent compounds of the series. To our knowledge, this is the first report of neuroprotective effects for compounds *(−)-(2S)-2′,4′-tetrahydroxy-5′-(1‴,1‴-dimethylallyl)-8-prenylpinocembrin* (8 PP, **1**) and *(−)-(2S)-8-prenylpinocembrin (*glabranin, ***2****)* against hydroxide peroxide-induced cell death evaluated in both, CGN and PC12d *in vitro* models. Additionally, we have reported important structure-activity relationships between the six evaluated flavanones. The substitution with an 8-prenyl group at the A-ring accompanied with an unsubstituted B-ring, or a 2′,4′-dihydroxy-5′-dimethylallyl substitution, lead to the most potent flavanones. *In silico* studies were also performed, and we informed a variety of putative targets for compounds **1** and **2** related to NDs. The acetylcholinesterase inhibitory activity suggested *in silico* was demonstrated for those potent compounds, being compound **2** more active than both compound **1** and the reference inhibitor physostigmine. Docking studies showed important contacts between selected compounds and the enzyme rationalizing their inhibitory activity.

In conclusion, the obtained *in vitro* results support the use of those compounds as inhibitors of AChE, which is a known target of Alzheimer's and Parkinson's diseases. In addition, *in silico* evidence suggest neuroprotection potential mediated by interaction with GSK-3β, tyrosine-protein kinase, Beta-secretase-1, Mitogen-activated protein kinase 14, Poly [ADP-ribose] polymerase 1, etc., being all of them targets explored to develop new therapeutic strategies. Therefore, this work has important implications and suggests that prenylated flavanones 8PP (**1**) and glabranin (**2**), could be used as lead molecules for the rational design of new active compounds, as well as for the development of future therapeutic strategies for the NDs treatment and prevention.

4. Experimental section

4.1. Plant material

The whole plant of *Dalea elegans* Gilles ex Hook. & Arn. *var. elegans* (Fabaceae) was collected in February 2012, near Cabalango (Córdoba, Argentina, GPS coordinates: latitude: 31°24′04.62″ South; longitude: 64°34′19.21″ West; height: 763 m). Plant material was identified by Prof. Dr. Gloria Barboza of the Botanical Museum, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina (CORD). A representative voucher specimen is on deposit as CORD Peralta 2. *D. pazensis* Rusby (Fabaceae) whole plant was collected in March 2013, in Yotala, a locality close to Sucre city (19°08′53″ S 65°15′48″ W at 2543 m above sea level). Plant material was identified by specialized personnel belonging at the Herbario del Sur de Bolivia (HSB) (Portal E. & López C.D.), and a voucher specimen is on deposit as 961A.

4.2. Isolation, purification and identification

Isolation, purification, and identification of the flavonoids were performed according to previously reported procedures [22,30]. Briefly, the whole plant of *D. elegans* and *D. pazensis* were dried at room temperature. After that, roots of *D. elegans* were extracted with benzene in a soxhlet extractor. The obtained extract was then subjected to column chromatography eluted with n-hexane/ethyl acetate and purified again over silica gel using chloroform/ethanol (95:5) to yield compound *(−)-(2S)-2′,4′-dihydroxy-5′-(1‴,1‴-dimethylallyl)-8-prenylpinocembrin* (8PP, **1**). Additionally, from the benzenic extract of aerial parts of *D. elegans (−)-(2S)-8-prenylpinocembrin* (glabranin, **2**) was obtained using the same methodology described above. Flavanones *(−)-(2S)-4′-hydroxy-2′-methoxy-5′-(1‴,1‴-dimethylallyl)-8-prenylpinocembrin* (Me8PP, **3**), *(−)-(2S)- 3′,4′-dihydroxy-6,2′-diprenylpinocembrin* (pazentin A, **4**) and, *(2S)-(−)-4′-hydroxy-2′-methoxy-5′-(1‴,1‴-dimethylallyl)-6-prenylpinocembrin* (pazentin B, **5**), were isolated from the benzenic extract of roots of *D. pazensis,* processed as described above. The natural compounds were purified using preparative TLC eluted with benzene/ethyl acetate (95:5).

4.3. Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless stated otherwise. Hydrogen peroxide (H_2O_2) was dissolved in distilled water and subsequently filtered, before being added to the cultures at a final concentration of 140 μM.

4.4. Neuronal cultures

Primary cerebellar granule neurons (CGN) were obtained from 6-8-day-old Sprague–Dawley rat pups [14], and seeded in poly-L-ornithine precoated 96-well plates, at a density of 2×10^5 cells/well. Cells were maintained in basal Eagle's medium, supplemented with 20 mM KCl and 25 mM L-Glutamine, at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2. Glial growth was inhibited with cytosine arabinose (10 μM).

All procedures involving animals and their care were approved by the ethics committee of the "Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable" (IIBCE), Montevideo, Uruguay. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

4.5. Evaluation of toxic effect per se and neuroprotective capacity of flavanones in CGN culture

To evaluate the toxic effect *per se* of flavanones in CGN cells, cultured at 6 days *in vitro* were pre-treated with different concentrations (0.5–300 μM) of each flavanone (1–6) (dissolved in DMSO, 0.2% final concentration) for 24 h and neuronal survival was determined. To determine the neuroprotective effects of flavanones, cells were treated with compounds (**1**–**6**) for 24 h and then exposed to 140 μM of hydrogen peroxide (H_2O_2) for another 24 h when neuronal survival was quantified. Neuronal survival was assessed by the MTT assay. For that, cells were incubated for 40 min at 37 °C with MTT (0.1 mg/mL final concentration). Formazan crystals formed were dissolved in DMSO and measured spectrophotometrically at 570 nm. Control cells were pre-treated with the vehicle [DMSO/culture medium (final concentration of DMSO, 0.01%)] and represented the 100% viability.

4.6. Immunocytochemistry

Neuronal cytoskeleton integrity was studied by immunofluorescence, using an anti-α-tubulin antibody (1/800 dilution) according to Nones et al. (2012) with minor modifications [58]. Briefly, cell cultures were fixed with 4% paraformaldehyde during 20 min at 4 °C and then were extensively washed. Cells were permeabilized with 0.2% Triton-X100 for 15 min at room temperature and then were blocked with horse serum and 0.1% Triton X-100 for 30 min. Finally, the cells were incubated overnight with the primary antibody anti-α-tubulin at 4 °C. After incubation cells were washed in PBS and incubated with the secondary antibody anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 488. Cell nuclei were labeled with Hoechst 33258 (10 μg/mL). Samples were observed with a confocal microscope (LSM ZEISS 800), using 20X objective, and ZEN Blue 2.3 software.

4.7. PC12d cells culture

PC12 cells were grown and maintained according to previously reported by Arredondo et al. [59]. PC12 cells culture were differentiated to neuronal type cells (PC12d) with the addition of 100 ng/mL of Nerve growth factor (NGF) in serum-free RPMI medium as described by Greene et al. (1976) [32].

4.8. Evaluation of toxic effect per se and cytoprotective effects of flavanones in PC12d cells culture

To assess the toxic effect of flavanones, 48 h after cells culture in collagen-precoated 96-well multi-well plates at a density of 2.5×10^5 cells/well, cells were pre-treated with different concentrations (0.5−50 μM) of compound 1 or 2 (dissolved in DMSO, 0.6% final concentration) for 24 h. Neutral red assay was performed to quantify alive cells. For that, cultures were treated with 50 μg/mL of neutral red for 2 h. The dye incorporated by the cells was extracted with a bleaching solution (50% ethanol 96%/1% glacial acetic acid in deionized water) and measured spectrophotometrically at 540 nm [60]. Control cells were treated with vehicle [DMSO/culture medium (10:90)].

To determine the cytoprotective effects, after 24 h of flavanones pre-treatments, 700 μM of a solution of H_2O_2 was added to induce a 50-70% cell death. 24 h after damage, neutral red assay was performed to determine the % of survival cells. Control cells were treated with vehicle.

4.9. Reverse virtual screening and molecular modeling

Reverse screening of potential protein targets of the flavanones with the best performance in neuroprotection assays was performed by a consensus of ligand similarity, pharmacophore matching, and reverse docking searches. Ligand similarity screening against reference ligands contained in the *PDBbind* and *Drugbank* databases was done with *SHAFTS* engine according to previous works [34,61–63]. *PharmMapper* server was employed to detect protein targets with a protein-ligand pharmacophore matching the query molecules [64]. Reverse docking was performed locally with *DockingApp* engine and in house scripts over all protein structures contained in *PDBbind* database [65]. *DockingApp* is a freely available wrapper application of *AutoDock Vina* designed for docking and virtual screening of FDA-approved molecules extracted from the *DrugBank* database. The consensus of these three search strategies was re-scored with state of the art docking score NNScore (Neuronal Network Score) and RF-Score (Random Forest Score) in order to increase accuracy [66,67]. Top ranking protein candidates were selected according to the docking score (≤-8 kcal/mol), and ligand efficiency comparisons between query ligand and reference ligands [68].

Molecular docking was performed on selected target Acetylcholinesterase (AChE, human homolog) using apo crystal structures 4ey5, 4ey6, 4ey7, 4m0e, 4m0f, 6o4w, and 6o4x to disclose **1** and **2** binding modes. Briefly, AChE binding site was iteratively explored using a space of 10 Å and 5 Å around the position of original co-crystallized ligand and poses from the first docking round, respectively. Binding modes were selected among the best ranking poses if they were consistently present in most crystal structures. Representations and contact information were gathered from *UCSF Chimera* [48] as well as *PLIP* [69] and *ProteinsPlus* [49] web servers.

4.10. In vitro validation of putative targets, acetylcholinesterase inhibition

Inhibitory activity of AChE was evaluated with the Ellman's method [70] and, according to previously informed by Vallejo et al. (2019) [71], with some modifications. Briefly, were added 23 μL (0.21 mM) of acetylthiocholine iodide (ATCI) to a mixture containing 151 μL (0.21 mM) of the Ellman's reactive (5,5′-dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid], DTNB), in phosphate buffer pH 7.4, the enzyme and, phosphate buffer pH 7.4 (control) or each compound dissolved in DMSO (>0.5%) at different concentrations. The enzyme was obtained using membranes of red blood cells isolated from human blood following the protocol informed by Vallejo et al. (2019) [71], that was approved by the ethics committee of the "Hospital Nacional de Clínicas" of the National University of Cordoba, Cordoba, Argentina.

Physostigmine salicylate was used as a positive control. The absorbance was monitored at 405 nm, first at 0 min and, at 30 min after incubation at room temperature. The percentage of inhibition of each compound was calculated respect to the control (100% of enzyme activity).

4.11. Statistics

All assays were independently performed in triplicate, and results were expressed as means ± SD of six separate experiments. The lethal concentration means (LC_{50}) values were estimated using the *GraphPad Prism* 6 software on a compatible computer. The results were analyzed by unidirectional analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's and Bonferroni's test for multiple comparisons using the mentioned software.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was supported by two consecutives Postdoctoral scholarships granted to PhD. M. Daniela Santi from the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina, Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay, and partially supported by Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay. D. Carvalho is PhD fellow of ANII (POS_NAC_2017_1_140673). M.A. Peralta, M.G. Ortega, J.L. Cabrera are members of the Researcher career of CONICET.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at

https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112718.

References

[1] L. Pogačnik, K. Pirc, I. Palmela, M. Skrt, K.S. Kwang, D. Brites, M.A. Brito, N.P. Ulrih, R.F.M. Silva, Potential for brain accessibility and analysis of stability of selected flavonoids in relation to neuroprotection *in vitro*, Brain Res. 1651 (2016) 17–26, https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.09.020.

[2] C. dos Santos Souza, M.S. Grangeiro, E.P. Lima Pereira, C.C. dos Santos, A.B. da Silva, G.P. Sampaio, D.D. Ribeiro Figueiredo, J.M. David, J.P. David, V.D.A. da Silva, A.M. Butt, S. Lima Costa, Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity, Neurotoxicology 65 (2018) 85–97, https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.001.

[3] J.R. Frandsen, P. Narayanasamy, Neuroprotection through flavonoid: enhancement of the glyoxalase pathway, Redox Biol. 14 (2018) 465–473, https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.015.

[4] S.F. Nabavi, H. Khan, G. D'onofrio, D. Šamec, S. Shirooie, A.R. Dehpour, S. Argüelles, S. Habtemariam, E. Sobarzo-Sanchez, Apigenin as neuroprotective agent: of mice and men, Pharmacol. Res. 128 (2018) 359–365, https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.10.008.

[5] J.H. Feng, X.L. Hu, X.Y. Lv, B.L. Wang, J. Lin, X.Q. Zhang, W.C. Ye, F. Xiong, H. Wang, Synthesis and biological evaluation of clovamide analogues with catechol functionality as potent Parkinson's disease agents *in vitro* and *in vivo*, Bioorg. Med. Chem. Lett 29 (2019) 302–312, https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.030.

[6] J. Ren, L. Yuan, W. Wang, M. Zhang, Q. Wang, S. Li, L. Zhang, K. Hu, Tricetin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in Parkinson's disease model by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway and preventing mitochondria-dependent apoptosis pathway, Toxicol. Appl. Pharmacol. (2019) 1–12, https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114617.

[7] E. Leem, Y.-S. Oh, W.-H. Shin, B.K. Jin, J.Y. Jeong, M. Shin, D.W. Kim, J.-H. Jang, H.-J. Kim, C.M. Ha, U.J. Jung, G.J. Moon, S.R. Kim, Effects of silibinin against prothrombin kringle-2-induced neurotoxicity in the nigrostriatal dopaminergic system *in vivo*, J. Med. Food 22 (2019) 277–285, https://doi.org/10.1089/jmf.2018.4266.

[8] S.S. Khatoon, M. Rehman, A. Rahman, The Role of Natural Products in Alzheimer's and Parkinson's Disease, first ed., Elsevier B.V., 2018 https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64058-1.00003-0.

[9] A. Xie, J. Gao, L. Xu, D. Meng, Shared mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease and Parkinson's disease, BioMed Res. Int. (2014) (2014) 1–8, https://doi.org/10.1155/2014/648740.

[10] S. Srivastav, M. Fatima, A.C. Mondal, Important medicinal herbs in Parkinson's disease pharmacotherapy, Biomed. Pharmacother. 92 (2017) 856–863, https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.137.

[11] D. Reglodi, J. Renaud, A. Tamas, Y. Tizabi, S.B. Socías, E. Del-Bel, R. Raisman-Vozari, Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides, Prog. Neurobiol. 155 (2017) 120–148, https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.10.004.

[12] H. Zhang, L. Bai, J. He, L. Zhong, X. Duan, L. Ouyang, Y. Zhu, T. Wang, Y. Zhang, J. Shi, Recent advances in discovery and development of natural products as source for anti-Parkinson's disease lead compounds, Eur. J. Med. Chem. 141 (2017) 257–272, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.068.

[13] H. Zhang, R. Tong, L. Bai, J. Shi, L. Ouyang, Emerging targets and new small molecule therapies in Parkinson's disease treatment, Bioorg. Med. Chem. 24 (2016) 1419–1430, https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.030.

[14] F. Arredondo, C. Echeverry, J.A. Abin-carriquiry, F. Blasina, K. Antúnez, D.P. Jones, Y. Go, Y. Liang, F. Dajas, Free Radical Biology & Medicine after cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation , increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult, Free Radic. Biol. Med. 49 (2010) 738–747, https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.020.

[15] J. Frandsen, P. Narayanasamy, Flavonoid enhances the glyoxalase pathway in cerebellar neurons to retain cellular functions, Sci. Rep. 7 (2017) 1–10, https://doi.org/10.1038/s41598-017-05287-z.

[16] A.T.R. Goes, C.R. Jesse, M.S. Antunes, F.V. Lobo Ladd, A.A.B. Lobo Ladd, C. Luchese, N. Paroul, S.P. Boeira, Protective role of chrysin on 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration a mouse model of Parkinson's disease: involvement of neuroinflammation and neurotrophins, Chem. Biol. Interact. 279 (2018) 111–120, https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.019.

[17] Z.V. Zheng, C.Y. Cheung, H. Lyu, H.Y. Chan, Y. Li, Z.X. Bian, K.K.W. Wang, W.S. Poon, Baicalein enhances the effect of low dose Levodopa on the gait deficits and protects dopaminergic neurons in experimental Parkinsonism, J. Clin. Neurosci. 64 (2019) 242–251, https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.02.005.

[18] H.J. Lee, B. Dhodary, J.Y. Lee, J.-P. An, Y.-K. Ryu, K.-S. Kim, C.-H. Lee, W.K. Oh, Dereplication of components coupled with HPLC-qTOF-MS in the active fraction of *Humulus japonicus* and it's protective effects against Parkinson's disease mouse model, Molecules 24 (2019) 1435, https://doi.org/10.3390/molecules24071435.

[19] C. Echeverry, F. Arredondo, M. Martínez, J.A. Abin-Carriquiry, J. Midiwo, F. Dajas, Antioxidant activity, cellular bioavailability, and iron and calcium management of neuroprotective and non-neuroprotective flavones, Neurotox. Res. (2014), https://doi.org/10.1007/s12640-014-9483-y.

[20] C. Echeverry, F. Arredondo, J.A. Abin-Carriquiry, J.O. Midiwo, C. Ochieng, L. Kerubo, F. Dajas, Pretreatment with natural flavones and neuronal cell survival after oxidative stress: a structure-activity relationship study, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 2111–2115, https://doi.org/10.1021/jf902951v.

[21] M. Caffaratti, M.G. Ortega, M.E. Scarafia, L. Ariza Espinar, H.R. Juliani, Prenylated flavanones from *Dalea elegans*, Phytochemistry 36 (1994) 1083–1084, https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90498-9.

[22] M.A. Peralta, M.D. Santi, A.M. Agnese, J.L. Cabrera, M.G. Ortega, Flavanoids from *Dalea elegans*: chemical reassignment and determination of kinetics parameters related to their anti-tyrosinase activity, Phytochem. Lett. 10 (2014) 260–267, https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.10.012.

[23] C. Perez, I.N. Tiraboschi, M.G. Ortega, A.M. Agnese, J.L. Cabrera, Further antimicrobial studies of 2',4'-dihidroxy-5'-(1'''-dimethylallyl)-6-prenylpinocembrin from *Dalea elegans*, Pharm. Biol. 41 (2003) 171–174, https://doi.org/10.1076/phbi.41.3.171.15090.

[24] S. Barceló, M. Peralta, M. Calise, S. Finck, G. Ortega, R.A. Diez, J.L. Cabrera, C. Pérez, Interactions of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* with fluconazole against azole- resistant *Candida albicans*, Phytomedicine 32 (2017) 24–29, https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.05.001.

[25] M.A. Peralta, M.G. Ortega, J.L. Cabrera, M.G. Paraje, The antioxidant activity of a prenyl flavonoid alters its antifungal toxicity on *Candida albicans* biofilms, Food Chem. Toxicol. 114 (2018) 285–291, https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.042.

[26] M.G. Ortega, M.E. Scarafia, H.R. Juliani, Antimicrobial agents in *Dalea elegans*, Fitoterapia 67 (1996) 81–82.

[27] M.A. Peralta, M. Calise, M.C. Fornari, M.G. Ortega, R.A. Diez, J.L. Cabrera, C. Pérez, A prenylated flavanone from *Dalea elegans* inhibits rhodamine 6 G efflux and reverses fluconazole-resistance in *Candida albicans*, Planta Med. 78 (2012) 981–987, https://doi.org/10.1055/s-0031-1298627.

[28] M.A. Peralta, M.A. da Silva, M.G. Ortega, J.L. Cabrera, M.G. Paraje, Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms, Phytomedicine 22 (2015) 975–980, https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.07.003.

[29] E. Thomas, I. Vandebroek, P. Goetghebeur, S. Sanca, S. Arrázola, P. Van Damme, The relationship between plant use and plant diversity in the Bolivian Andes, with special reference to medicinal plant use, Hum. Ecol. 36 (2008) 861–879, https://doi.org/10.1007/s10745-008-9208-z.

[30] M.D. Santi, M.A. Peralta, C.S. Mendoza, J.L. Cabrera, M.G. Ortega, Chemical and bioactivity of flavanones obtained from roots of *Dalea pazensis* Rusby, Bioorg. Med. Chem. Lett 27 (2017) 1789–1794, https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.058.

[31] L.A. Greene, A.S. Tischler, PC12 Pheochromocytoma cultures in neurobiological research, Adv. Cell Neurobiol. (1982), https://doi.org/10.1016/B978-0-12-008303-9.50016-5.

[32] L.A. Greene, J.M. Aletta, A. Rukenstein, S.H. Green, PC12 pheochromocytoma cells: culture, Nerve growth factor treatment, and experimental exploitation, Methods Enzymol. 147 (1987) 207–216, https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)47111-5.

[33] C. Kang, L. Wang, M. Kang, X. Liu, Y. Fu, J. Gao, Baicalin alleviates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in PC12 cells by down-regulation of microRNA-192-5p, Brain Res. 1708 (2019) 84–92, https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.015.

[34] D. Carvalho, M. Paulino, F. Polticelli, F. Arredondo, R.J. Williams, J.A. Abin-Carriquiry, Structural evidence of quercetin multi-target bioactivity: a reverse virtual screening strategy, Eur. J. Pharmaceut. Sci. 106 (2017) 393–403, https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.028.

[35] F. Dajas, A.-C. Juan Andres, A. Florencia, E. Carolina, R.-M. Felicia, Neuroprotective actions of flavones and flavonols: mechanisms and relationship to flavonoid structural features, Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem. 13 (2013) 30–35, https://doi.org/10.2174/1871524911313010005.

[36] X. Dong, L. Qi, C. Jiang, J. Chen, E. Wei, Y. Hu, Synthesis, biological evaluation of prenylflavonoids as vasorelaxant and neuroprotective agents, Bioorg. Med. Chem. Lett 19 (2009) 3196–3198, https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.04.120.

[37] J.W. Jung, W.M. Ko, J.H. Park, K.H. Seo, E.J. Oh, D.Y. Lee, D.S. Lee, Y.C. Kim, D.W. Lim, D. Han, N.I. Baek, Isoprenylated flavonoids from the root bark of Morus alba and their hepatoprotective and neuroprotective activities, Arch Pharm. Res. 38 (2015) 2066–2075, https://doi.org/10.1007/s12272-015-0613-8.

[38] S. Bi, L. Yan, B. Pang, Y. Wang, Investigation of three flavonoids binding to bovine serum albumin using molecular fluorescence technique, J. Lumin. 132 (2012) 132–140, https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2011.08.014.

[39] A. Johari, A.A. Moosavi-movahedi, M. Amanlou, Computational investigation of inhibitory mechanism of flavonoids as bovine serum albumin anti-glycation agents, DARU J. Pharm. Sci. 22 (2014) 1–12, https://doi.org/10.1186/s40199-014-0079-0.

[40] R. Geng, M. Lei, L. Liangliang, X. Yixi, Influence of bovine serum albumin-flavonoid interaction on the antioxidant activity of dietary Flavonoids : new evidence from electrochemical quantification, Molecules 24 (2019) 1–9, https://doi.org/10.3390/molecules24010070.

[41] G.L. Russo, M. Russo, C. Spagnuolo, I. Tedesco, S. Bilotto, R. Iannitti, R. Palumbo, Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer, Canc. Treat Res. 159 (2014) 185–205, https://doi.org/10.1007/978-3-642-38007-5_11.

[42] D.-X. Hou, T. Kumamoto, Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling, Antioxidants Redox Signal. 13 (2010) 691–719, https://doi.org/10.1089/ars.2009.2816.

[43] X.X. Yan, C. Ma, W.P. Gai, H. Cai, X.G. Luo, Can BACE1 inhibition mitigate early axonal pathology in neurological diseases? J. Alzheim. Dis. 38 (2014) 705–718, https://doi.org/10.3233/JAD-131400.
[44] T. Müller, Catechol-O-methyltransferase inhibitors in Parkinson's disease, Drugs 75 (2015) 157–174, https://doi.org/10.1007/s40265-014-0343-0.
[45] M.B. Colovic, D.Z. Krstic, T.D. Lazarevic-Pasti, A.M. Bondzic, V.M. Vasic, Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology, Curr. Neuropharmacol. 11 (2013) 315–335, https://doi.org/10.2174/1570159x11311030006.
[46] H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T.L. Rosenberry, J.L. Sussman, Acetylcholinesterase: from 3D structure to function, Chem. Biol. Interact. 187 (2010) 10–22, https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042.
[47] J. Cheung, E.N. Gary, K. Shiomi, T.L. Rosenberry, Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone i and territrem B show peripheral site flexibility, ACS Med. Chem. Lett. 4 (2013) 1091–1096, https://doi.org/10.1021/ml400304w.
[48] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1605–1612, https://doi.org/10.1002/jcc.20084.
[49] R. Fährrolfes, B. Stefan, F. Flachsenberg, A. Meyder, E. Nittinger, T. Otto, A. Volkamer, M. Rarey, ProteinsPlus: a web portal for structure analysis of macromolecules, Nucleic Acids Res. 45 (2017) 337–343, https://doi.org/10.1093/nar/gkx333.
[50] B.R. Thanvi, S.K. Munshi, N. Vijaykumar, T.C.N. Lo, Neuropsychiatric non-motor aspects of Parkinson's disease, Postgrad. Med. 79 (2003) 561–565, https://doi.org/10.1136/pmj.79.936.561.
[51] G. Pagano, G. Rengo, G. Pasqualetti, G.D. Femminella, F. Monzani, N. Ferrara, M. Tagliati, Cholinesterase inhibitors for Parkinson's disease : a systematic review and meta-analysis, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry (2014) 1–7, https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-308764.
[52] J.N. Caviness, L. Lue, C.H. Adler, D.G. Walker, Parkinson ' s disease dementia and potential therapeutic strategies, CNS Neurosci. Ther. 17 (2011) 32–44, https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00216.x.
[53] S. Perez-lloret, F.J. Barrantes, Deficits in cholinergic neurotransmission and their clinical correlates in Parkinson's disease, Nat. Publ. Gr. (2016) 1–16, https://doi.org/10.1038/npjparkd.2016.1.
[54] R.B. Schneider, J. Iourinets, I.H. Richard, Parkinson' s disease psychosis : presentation , diagnosis and management, Neurodegener. Dis. Manag. (2017) 1–12, https://doi.org/10.2217/nmt-2017-0028.
[55] V.N. Talesa, Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease, Mech. Ageing Dev. 122 (2001) 1961–1969, https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00309-8.
[56] I. Zueva, J. Dias, S. Lushchekina, V. Semenov, M. Mukhamedyarov, T. Pashirova, V. Babaev, F. Nachon, N. Petrova, L. Nurullin, L. Zakharova, V. Ilyin, P. Masson, K. Petrov, Neuropharmacology New evidence for dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase as improved drugs for treatment of Alzheimer's disease, Neuropharmacology 155 (2019) 131–141, https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.05.025.
[57] M. Mehta, A. Adem, M. Sabbagh, New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, Int. J. Alzheimer' Dis. 2012 (2012) 1–8, https://doi.org/10.1155/2012/728983.
[58] J. Nones, T.C.L. de Sampaio Spohr, F. Carvalho Alcantara Gomes, Effects of the flavonoid hesperidin in cerebral cortical progenitors in vitro: indirect action through astrocytes, Int. J. Dev. Neurosci. 30 (2012) 303–313, https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2012.01.008.
[59] M.F. Arredondo, F. Blasina, C. Echeverry, A. Morquio, M. Ferreira, J.A. Abin-Carriquiry, L. Lafon, F. Dajas, Cytoprotection by Achyrocline satureioides (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress, J. Ethnopharmacol. 91 (2004) 13–20, https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.012.
[60] G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, Nat. Protoc. 3 (2008) 1125–1131, https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75.
[61] X. Liu, H. Jiang, H. Li, SHAFTS : a hybrid approach for 3D molecular similarity calculation . 1 . Method and assessment of virtual screening, J. Chem. Inf. Model. 51 (2011) 2372–2385, https://doi.org/10.1021/ci200060s.
[62] Z. Liu, Y. Li, L. Han, J. Li, J. Liu, Z. Zhao, W. Nie, Y. Liu, R. Wang, PDB-wide collection of binding data : current status of the PDBbind database, Bioinformatics 31 (2015) 405–412, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu626.
[63] D.S. Wishart, DrugBank and its relevance to pharmacogenomics, Pharmacogenomics 9 (2008) 1155–1162, https://doi.org/10.2217/14622416.9.8.1155.
[64] X. Wang, Y. Shen, S. Wang, S. Li, W. Zhang, X. Liu, L. Lai, J. Pei, H. Li, PharmMapper 2017 update : a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database, Nucleic Acids Res. 45 (2017) 356–360, https://doi.org/10.1093/nar/gkx374.
[65] E. Di Muzio, D. Toti, F. Polticelli, DockingApp: a user friendly interface for facilitated docking simulations with AutoDock Vina, J. Comput. Aided Mol. Des. 31 (2017) 213–218, https://doi.org/10.1007/s10822-016-0006-1.
[66] J.D. Durrant, J.A. Mccammon, NNScore 2 .0 : a neural-network receptor-ligand scoring function, J. Chem. Inf. Model. 51 (2011) 2897–2903, https://doi.org/10.1021/ci2003889.
[67] M. Wójcikowski, P.J. Ballester, P. Siedlecki, Performance of machine-learning scoring functions in structure-based virtual screening, Nat. Publ. Gr. (2017) 1–10, https://doi.org/10.1038/srep46710.
[68] M.M. Cavalluzzi, G.F. Mangiatordi, O. Nicolotti, G. Lentini, Ligand efficiency metrics in drug discovery : the pros and cons from a practical perspective perspective, Expet Opin. Drug Discov. (2017) 1–18, https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1365056.
[69] S. Salentin, S. Schreiber, V.J. Haupt, M.F. Adasme, M. Schroeder, PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler, Nucleic Acids Res. 43 (2015) W443–W447, https://doi.org/10.1093/nar/gkv315.
[70] G. Ellman, K. Courtney, V. Andres, R. Jr Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem. Pharmacol. 7 (1961) 88–95, https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9.
[71] M.G. Vallejo, M.E. Corzo, M.G. Ortega, A.M. Agnese, 12α-hydroxy-N-demethylsauroxine, a lycodane type alkaloid from *Phlegmariurus saururus*, Nat. Prod. Res. (2019) 1–6, https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1560287.