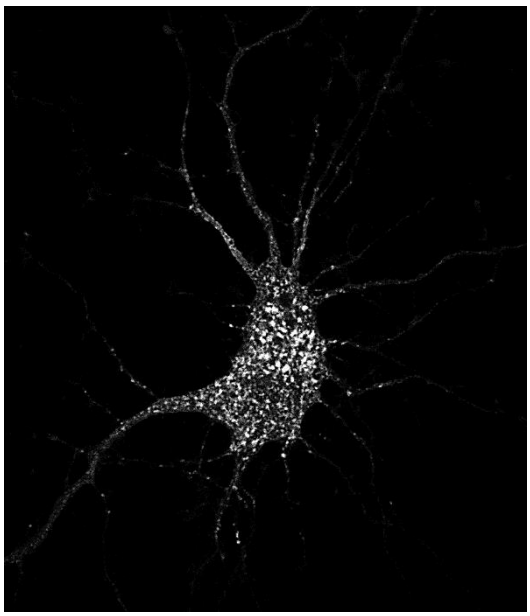
Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Ciencias Biológicas

"CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN cyp46a1 DURANTE EL ENVEJECIMIENTO EN CEREBRO DE RATÓN"



Tesinista: Setiembre Delfina Elorza Firma:.....

Director: Dr. Mauricio Gerardo Martín Firma:.....

Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra INIMEC-CONICET-UNC

Año 2017

“CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN cyp46a1 DURANTE EL ENVEJECIMIENTO EN CEREBRO DE RATÓN”

TRIBUNAL EXAMINADOR:

Dr. Gustavo Baiardi Firma: ……

Dra. Melina Musri Firma: ……

Dra. María Angélica Rivarola Firma: ……

Calificación: …….

Fecha: ……

ÍNDICE

Resumen ……...4
Introducción ……... 5
Hipótesis Y Objetivos …….. 12
Materiales Y Métodos ……. 14
Resultados ……24
Discusión ……45
Bibliografía ……51
Agradecimientos ……56

“CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN cyp46a1 DURANTE EL ENVEJECIMIENTO EN CEREBRO DE RATÓN”

RESÚMEN

Durante el envejecimiento se producen cambios en la composición lipídica de membranas neuronales. En la mayoría de los casos, estas alteraciones lipídicas han sido relacionadas a la aparición de problemas cognitivos, tanto en envejecimiento regular como patológico. Específicamente, en el laboratorio hemos observado que el envejecimiento de neuronas hipocampales está asociado a un incremento en los niveles de la enzima colesterol-24-hidroxilasa o CYP46, lo cual produce una disminución del colesterol de membrana, y resulta en una reducida función sináptica y pérdida de memoria. Sin embargo, el aumento de los niveles de esta enzima con el envejecimiento ha sido analizado en muestras de hipocampo total, sin realizar distinción entre las distintas subregiones hipocampales. Tampoco se habían analizado hasta el momento cambios de los niveles de CYP46 con el envejecimiento en otras regiones del cerebro. Por lo tanto, en el presente trabajo se analizaron los niveles de CYP46 mediante inmunohistoquímica, comparando secciones sagitales de cerebros pertenecientes a ratones jóvenes y viejos. En animales viejos, se observó aumento en los niveles de la enzima en hipocampo, cerebelo y corteza, áreas estrechamente relacionadas a aprendizaje y memoria. Además, mediante inmunofluorescencia se determinó, en cultivos primarios de neuronas hipocampales, la distribución subcelular de CYP64 cuando esta se encuentra en niveles normales y cuando se encuentra sobreexpresada. Por último, se compararon dos herramientas destinadas a la detección y estudio de la distribución de colesterol en neuronas hipocampales.

INTRODUCCIÓN

Debido a que la edad es el factor más estrechamente ligado a síndromes neurodegenerativos, el estudio del envejecimiento cerebral se ha convertido en un tema fundamental dentro de la investigación actual de las neurociencias. El envejecimiento se encuentra asociado con la pérdida de capacidades cognitivas, de hecho, la gran mayoría de los individuos mayores de 65 años desarrolla patologías leves conocidas como pérdida de memoria asociada a la vejez (age-associated memory impairment or AAMI; Crook *et al*., 1986). Por este motivo, a medida que el promedio de vida de la población aumenta, se hace necesario conocer cuáles son los mecanismos que producen este tipo de pérdida de memoria, para ayudar a la población de edad avanzada a conservar su capacidad de aprendizaje y memoria.

Análisis realizados en diferentes áreas cerebrales, tanto en humanos como en roedores, han confirmado la ocurrencia de alteraciones en la composición de lípidos durante el envejecimiento (Ledesma *et al*., 2012). En la mayoría de los casos, estas alteraciones han sido relacionadas a la aparición de problemas cognitivos, tanto en envejecimiento regular como patológico (Bertram *et al*., 2002; Martín *et al*., 2010).

Resulta particularmente interesante el caso del colesterol, dado que se ha demostrado que con el envejecimiento, los niveles de este lípido se ven notablemente alterados en ciertas áreas cerebrales (Ledesma *et al*., 2012; Tabla 1). La reducción de colesterol ha sido descripta tanto en el envejecimiento de neuronas hipocampales de ratón (Martin *et al*., 2008; Sodero *et al*., 2011), como en hipocampo o corteza de ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer (Xie *et al*., 2003) y en muestras humanas de cerebros sanos o con diagnóstico de Alzheimer (Thelen *et al*., 2006; Svennerholm *et al*.,1991; Soderberg *et al*., 1990; revisado en Martín *et al*., 2014a). Sin embargo, también existen evidencias que indican que no hay un cambio en la cantidad absoluta de colesterol en el hipocampo durante el envejecimiento (Soderberg *et al*., 1990), o que el colesterol aumenta en la hemicapa exofacial de las membranas sinápticas con la edad (Igbavboa *et al*., 1997; Wood *et al*., 1999, ver Tabla 1).

COLESTEROL	CAMBIOS REPORTADOS
Cerebro total de rata (24 meses)	Incremento
Hipocampo de humano (entre 89 y 92 años)	Disminución
Corteza de humano (entre 80 y 99 años)	Disminución
Cultivo de neuronas hipocampales (26 DIV)	Disminución
Sinaptosomas de ratón (21-25 meses)	Disminución Incremento en la hemicapa lipídica exofacial de membranas sinaptosomales

Tabla 1: Cambios observados en los niveles de colesterol en distintas áreas del cerebro envejecido (adaptado de Ledesma *et al*., 2012).

Resulta lógico asumir que el metabolismo de colesterol en las diferentes regiones del cerebro no es uniforme (Kabara *et al*., 1973) y que durante el envejecimiento regular, el contenido de colesterol del cerebro podría cambiar en forma diferencial según la región estudiada. En efecto, se han reportado diferencias en el contenido de colesterol de acuerdo a la región analizada (Zhang *et al*., 1996; Tabla 1). De acuerdo a esto, también se han encontrado diferencias en la distribución de lipoproteínas transportadoras de colesterol y en la distribución de receptores para lipoproteínas (Bu *et al*., 1994), como así también variaciones en la expresión de enzimas de la vía de síntesis de colesterol (Runquist *et al*., 1995).

METABOLISMO DE COLESTEROL EN EL CEREBRO

El colesterol es esencial para el funcionamiento de las células eucariotas. Es un componente predominante de la membrana plasmática y junto a otros lípidos, juega un rol esencial en su fluidez, en la permeabilidad a los iones y en la organización de dominios de membrana o balsas lipídicas, los cuales constituyen importantes plataformas de señalización (Simons *et al*., 2000; Haines *et al*., 2010).

Fuera del cerebro, los requerimientos de colesterol son cubiertos tanto por la síntesis *de novo* como por la asimilación del colesterol consumido en la dieta, transportado bajo la forma de complejos colesterol-lipoproteínas.

El cerebro de mamíferos posee el contenido más alto y estable de colesterol en comparación con otros órganos o tejidos, con una vida media alrededor de 100 veces mayor que en otros órganos. El cerebro contiene aproximadamente el 25% del colesterol del organismo, a pesar de que este órgano sólo representa el 2% del peso corporal total (Kotti *et al*., 2006). Dentro del cerebro, el 70% del colesterol cerebral se encuentra asociado a las vainas de mielina elaboradas por los oligodendrocitos, el cual es un material altamente especializado que actúa como un aislante eléctrico a lo largo de los axones.

Debido a la presencia de una eficiente barrera hematoencefálica, el cerebro no puede incorporar colesterol del sistema circulatorio periférico, por lo que depende de la síntesis *de novo* para mantener los niveles requeridos de este lípido. Este proceso de síntesis de colesterol posee un costo energético muy alto y requiere de numerosas reacciones enzimáticas que llevan a la formación de colesterol a partir de acetil-CoA (Figura 1). El paso limitante de la vía es aquel llevado a cabo por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductase), perteneciente al retículo endoplasmático.

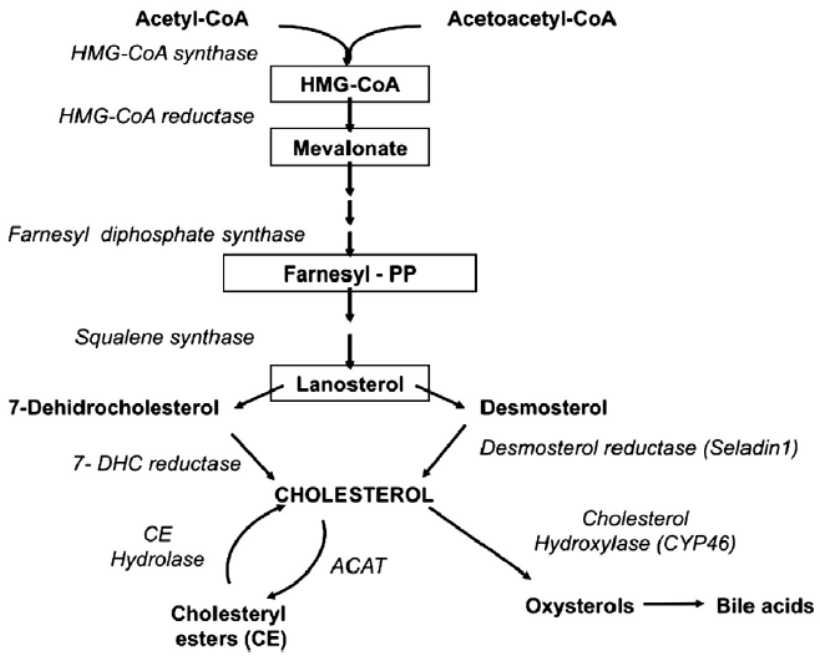


Figura 1: Síntesis y degradación del colesterol en el cerebro (extraído de Martin *et al*., 2010).

Los oligodendrocitos poseen la tasa más alta de síntesis de colesterol, seguida por los astrocitos. Las neuronas en cambio, poseen una elevada tasa de síntesis de colesterol durante su desarrollo y maduración, dado que este lípido se requiere para formar axones, dendritas y conexiones sinápticas (Martin *et al*., 2010). Sin embargo una vez maduras, las neuronas confían el costoso proceso de síntesis de colesterol a los astrocitos, el cual es importado por las neuronas en forma de complejo con la apolipoproteína E (ApoE), a través de los receptores LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1; Pfrieger y Ungerer, 2011; Figura 2).

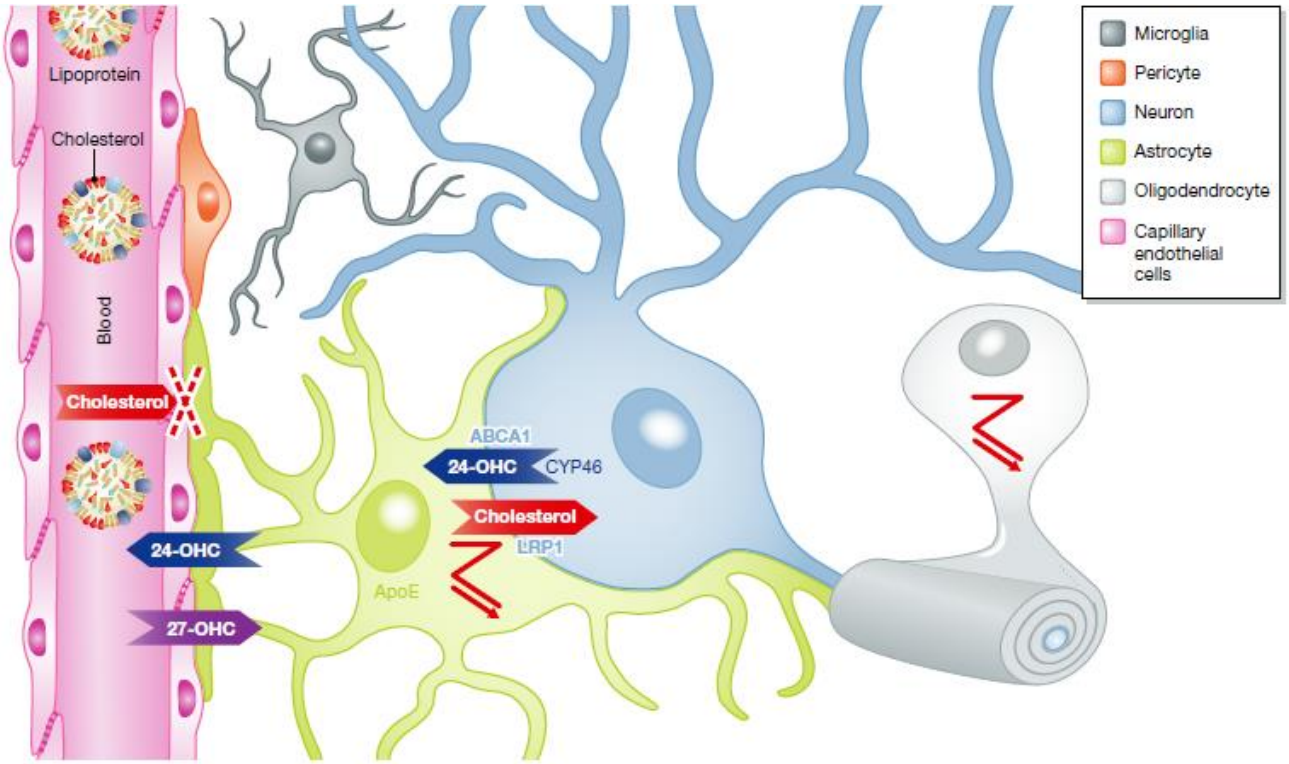


Figura 2: El metabolismo del colesterol en el cerebro. Las flechas rojas representan los sitios de síntesis de colesterol (extraído de Martin *et al*., 2014b).

Para mantener su homeostasis, los procesos de síntesis y eliminación de colesterol del cerebro deben estar estrictamente regulados, y por lo tanto existen mecanismos específicos para eliminar el exceso de colesterol neuronal. Las neuronas son capaces de eliminar el exceso de colesterol mediante tres procesos diferentes: i) por esterificación mediante la enzima acil coenzima A colesterol aciltransferasa 1, también llamada esterol O-acil trasferasa 1 (ACAT1 o SOAT1), localizada en el retículo endoplasmático. Por acción de esta enzima, el colesterol es esterificado y luego almacenado intracelularmente en depósitos de reserva o gotas lipídicas; ii) por excreción directa bajo la forma de complejos ApoE-colesterol, en un proceso de flujo reverso mediado por transportadores de tipo ABC (Pfrieger y Ungerer 2011); iii) mediante su conversión en 24-hidroxicolesterol, el cual al poseer una mayor polaridad que el colesterol, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica para luego ser metabolizado en el hígado. Este paso es catalizado por la enzima colesterol-24-hidroxilasa, o CYP46, localizada exclusivamente en el sistema nervioso central. Esta última vía constituye el principal mecanismo de

eliminación de colesterol del cerebro, ya que el 40% de este lípido es eliminado de esta forma; Lund *et al*., 2003) (Figura 2 y 3).

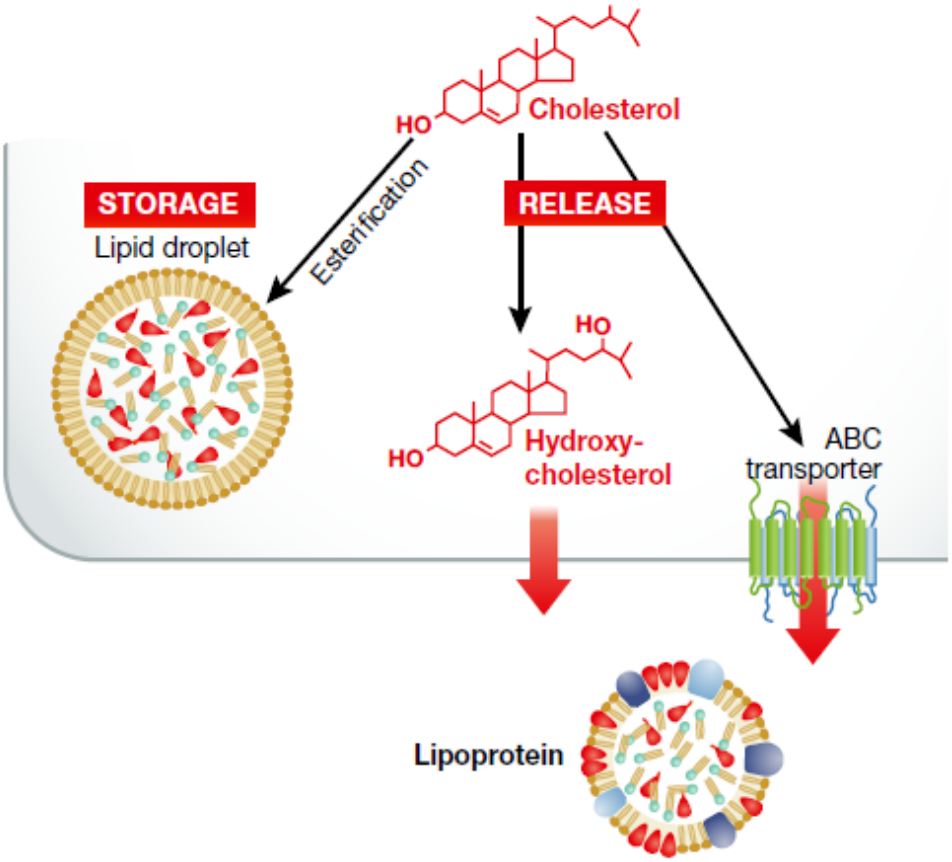


Figura 3: Mecanismos de eliminación del colesterol neuronal (extraído de Martin *et al*., 2014b).

LA COLESTEROL-24-HIDROXILASA

La enzima CYP46 es una proteína de retículo endoplásmico y miembro de la familia de citocromos P450, que se encuentra primordialmente localizada en la materia gris del sistema nervioso central (Lund *et al*., 1999). Específicamente, experimentos de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ* de ARNm indican que el gen *cyp46A1*, que codifica para la enzima colesterol 24-hidroxilasa, se expresa principalmente en neuronas piramidales e interneuronas de hipocampo y corteza y en células de Purkinje en el cerebelo (Lund *et al*., 1999, Ramirez *et al*., 2008).

Los primeros estudios realizados para caracterizar cambios en los niveles de CYP46 fueron realizados en extractos totales de cerebros de ratón. Estos estudios indican que la proteína CYP46 se acumula gradualmente a partir del primer día post natal hasta los 9 meses de edad (Lund *et al*., 1999). Otros trabajos han descripto alteraciones en el patrón de expresión de este gen en diferentes condiciones patológicas. Por ejemplo, Cartagena *et al*. (2008) han observado un aumento en la expresión de *cyp46a1* en microglía activada por daño cortical o por acción de moléculas pro-inflamatorias. Otros trabajos han demostrado también que la expresión de *cyp46A1* aumenta selectivamente en neuritas en degeneración y en células astrogliales de cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Bogdanovic *et al*. 2001; Brown *et al*., 2004). El significado fisiológico de estos cambios en el patrón de expresión de cyp46A1 aún no se ha dilucidado.

En particular, en trabajos previos del laboratorio se ha observado que el envejecimiento de neuronas hipocampales está asociado a un aumento del 50% en los niveles de expresión del gen *cyp46A1*, medido mediante PCR en tiempo real, en muestras de ARN total preparado a partir de hipocampos de ratones jóvenes (de 4 meses de edad) y viejos (de 20 meses). El aumento en los niveles de proteína también se observó mediante inmunofluorescencia en cultivos de neuronas hipocampales de rata mantenidos durante 25 días *in vitro* (DIV). Estos cultivos a largo plazo han sido utilizados en el laboratorio como modelo de envejecimiento *in vitro* (Martin *et al*., 2008; Sodero *et al*., 2011).

Análisis realizados a fin de determinar los factores capaces de inducir la expresión del gen *cyp46A1* han demostrado que la acumulación de especies reactivas del oxígeno es capaz de incrementar de manera significativa la actividad transcripcional de este gen (Ohyama *et al*., 2006, Sodero *et al*., 2011). Por lo tanto, estos datos sugieren que el aumento de los niveles de estrés oxidativo, fenómeno característico del envejecimiento, sería la señal que gatilla el incremento de los niveles de CYP46, lo que resulta en una pérdida de colesterol neuronal (Martin *et al*., 2014b).

EFECTO DE LA PÉRDIDA DE COLESTEROL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA FUNCIÓN NEURONAL

En trabajos previos, se ha demostrado que los procesos cognitivos requieren de una estricta regulación en los niveles de síntesis y degradación de colesterol en neuronas. Estos trabajos muestran que alteraciones en la síntesis o transporte de lipoproteínas disminuye la plasticidad sináptica y por lo tanto las funciones cognitivas (Matthies *et al*., 1997; Blalock *et al*., 2003; Kotti *et al*., 2006). Esto se debe no sólo al rol del colesterol como componente estructural, confiriendo a las membranas neuronales fluidez y permeabilidad óptimas, sino también como componente de plataformas lipídicas de señalización, cuya integridad se requiere para el correcto funcionamiento de receptores neuronales (Martin *et al*., 2008, Ledesma *et al*., 2012). Por lo tanto, resulta evidente que el incremento en los niveles de CYP46 que se produce durante el envejecimiento, con la subsiguiente alteración en los niveles de colesterol en neuronas, resultará en una reducida función sináptica y pérdida de memoria (Martin *et al*., 2014a).

En concordancia con todo lo antes mencionado, se ha observado que tanto la perfusión de una solución de colesterol en el ventrículo lateral de ratas Wistar viejas (de 24 meses) como la inhibición farmacológica de CYP46 en ratones viejos, permite rescatar defectos cognitivos *in vivo*, evaluados mediante el test de Morris (Martin *et al*., 2014a; Palomer *et al*., 2016).

Todos estos datos nos llevaron a formular la **hipótesis** de que el envejecimiento, a través de la acumulación de estrés oxidativo, induce la expresión localizada del gen cyp46A1 principalmente en aquellas regiones del cerebro involucradas en aprendizaje y formación de memoria.

OBJETIVOS

Como se comentaba en la Introducción, trabajos previos realizados en el laboratorio han demostrado que durante el envejecimiento existe un aumento de expresión del gen *cyp46A1* analizado en muestras de ARN y proteína obtenidas de hipocampo total de ratones jóvenes y viejos (Martin *et al*., 2008). Sin embargo no se ha descripto aún si los mayores niveles de CYP46 encontrados en animales viejos corresponden a un aumento de expresión de *cyp46A1* en las mismas regiones hipocampales donde se expresa en animales jóvenes o si el envejecimiento involucra además la acumulación de CYP46 en otras áreas.

Además, como segundo objetivo de este trabajo de Tesina, nos propusimos determinar la distribución subcelular de CYP46 y de colesterol, en neuronas con elevados niveles intracelulares de esta enzima.

Para contestar a estos interrogantes formulamos los siguientes ***Objetivos Específicos****:*

1. *Identificar las regiones del cerebro donde se produce un aumento en los niveles de CYP46 con el envejecimiento*

2. *Determinar la ubicación subcelular de CYP46 cuando esta se encuentra sobreexpresada en neuronas hipocampales*

3. *Optimizar una herramienta para detectar la distribución del colesterol en neuronas hipocampales*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones de la Cepa C57Bl/6 jóvenes de 3 a 5 meses (n=8) y viejos de 20 a 24 meses (n=5), con un rango de 30-40gr de peso corporal pertenecientes al bioterio del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra. Los animales fueron mantenidos con temperatura controlada (22 ± 1º) bajo un ciclo de luz oscuridad de 12 horas y con libre acceso a agua y alimento. Todos los procedimientos fueron conducidos de acuerdo con la Guía de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

2. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS HIPOCAMPALES

El cultivo primario de neuronas fue preparado tomando como base el protocolo descripto por Kaech y Banker (2007).
Una rata preñada de 18 días de gestación fue anestesiada en una cámara de CO2, luego se realizó la disección, se extrajeron los cerebros de los embriones y se los mantuvo en capsulas de Petri con medio Hanks' frio. Se extrajeron los hipocampos y se lo incubo con Hanks' conteniendo 0,25% de tripsina durante 15 minutos en baño a 37º. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con Hanks' y luego se agregó MEM10%-Normal Horse Serum (NHS) y se realizó la disociación mecánica con pipetas Pasteur de diámetros decrecientes, hasta la mitad del diámetro original, para lograr una suspensión homogénea de células. A continuación se sembraron ~100000 células en cápsulas de 35mm con 4 vidrios de 12mm cada una y se las colocó en estufa de cultivo durante 2 horas. Finalmente se cambió el medio a Neurobasal (Gibco) sumplementado con B27 y Glutamax y se colocaron en un incubador a 37º y 5% de CO_2. Cada 72 horas se cambió 1/3 del medio y se agregó fresco.

3. ANTICUERPOS

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

- CYP46A1: dilución 1:500 policlonal generado en conejo (Proteintech)
- β3 Tubulina: dilución 1:500 policlonal generado en conejo (Abcam)
- TAU1: dilución 1:1000 monoclonal generado en ratón (clone PC1C6, Merck)
- MAP2: dilución 1:600 monoclonal generado en ratón (clone AP20, Sigma)

Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios:

- Anticuerpo biotinilado dilución 1:200 generado en burro anti conejo (Biotin-SP-Conjugated, Jackson Immuno Research)
- Alexa Fluor® 633 dilución 1:1000 generado en cabra anti ratón (Thermo Fisher Scientific)
- Alexa Fluor® 488 dilución 1:1000 generado en cabra anti conejo (Thermo Fisher Scientific)

4. PLÁSMIDOS

- pCyp46-EGFP resistente a kanamicina (Cedido por el grupo de Carlos G. Dotti; Martin *et al*., 2008)
- pDEST40-mCherry-D4: resistente a ampicilina (Cedido por el grupo de Carlos G. Dotti; Brachet *et al*., 2016)
- pLV-eGFP: resistente a ampicilina (Addgene)
- pET-28-EGFP-D4: resistente a kanamicina (Cedido por el grupo de Yukiko Shimada; Shimada *et al*., 2002)

5. MICROSCOPÍA

Para el análisis de las secciones de tejido se utilizó un microscopio Zeiss® Axioskop equipado con una cámara Leica DC 200. Se tomaron fotografías utilizando el programa Leica DC 200 en aumentos de 5X, 10X y 20X, y fueron procesadas a través del programa Fiji (ImageJ). El brillo y el contraste fueron ajustados al mismo

nivel al comparar las secciones obtenidas de animales jóvenes y viejos.

Para el análisis de las células transfectadas e inmunofluorescencia, se utilizó un microscopio de epifluorescencia Zeiss® Axiovert equipado con una cámara Hamamatsu ORCA-ER y se tomaron fotografías utilizando el programa Micro-Manager (ImageJ) en aumentos de 100X. Se utilizó también un microscopio confocal Zeiss® Axio observer LSM 800 y se tomaron fotografías utilizando el programa Micro-Manager (ImageJ) en aumentos de 60X.
Todas las fotografías obtenidas fueron procesadas a través del programa Fiji (ImageJ). El brillo y el contraste fueron ajustados al mismo nivel en todos los casos.

6. ANÁLISIS ESTADISTICO

Las diferencias estadísticas de los datos obtenidos a partir de la cuantificación de intensidad de fluorescencia en células transfectadas se analizaron mediante: test de normalidad (Test de Shapiro Wilks), test de homogeneidad de varianza (Test de Bartlett) y finalmente un análisis T de Student. Se utilizó el software R para el análisis estadístico y para la obtención del gráfico.

7. INMUNOHISTOQUÍMICA

7.1. Obtención del material histológico

Los animales fueron anestesiados con 5% hidrato cloral (0,5ml/100g) y perfundidos transcardíacamente con una bomba de perfusión en primer lugar con 50ml de solución lavadora (0,4% Glucosa, 0,8% Sacarosa, 0,8% NaCl, 10u/ml Heparina) y luego con 150ml de solución fijadora (4 % paraformaldehído, 1% ácido bórico, 0,38% di-sodio tetra-borato, 0,004% sulfito de sodio). Los cerebros permanecieron en la caja craneal durante 24 horas a 4º C y luego fueron extraídos.
3 cerebros pertenecientes a ratones jóvenes se dividieron por sus hemisferios, la mitad de estos fueron envueltos en gaza y luego se realizaron los pasos de deshidratación, aclaración e inclusión en parafina. A continuación, fueron seccionados a 10µm en micrótomo MSE® y colocados sobre portaobjetos

gelatinizados.
Los hemisferios restantes fueron equilibrados en 30% de sacarosa en agua, con función crioprotectora, y posteriormente seccionados a 40µm en criostato Leica® CM1850. Las secciones se colocaron sobre portaobjetos gelatinizados.
Por otro lado, 5 cerebros pertenecientes a ratones jóvenes y 5 cerebros pertenecientes a ratones viejos, fueron colocados en 30% de sacarosa en agua, para posteriormente ser seccionados a 40µm con micrótomo de congelación Microm® HM430. Luego las secciones se colocaron en buffer fosfato salino (PBS; 1,86mM NaH_2PO_4, 8,41mM Na_2HPO_4, 175mM NaCl, pH 7,4) hasta el momento de ser procesadas para inmunohistoquímica.

7.2. Inmunohistoquímica en secciones obtenidas mediante micrótomo

En primer lugar se procedió a desparafinizar los cortes, sumergiendo los vidrios conteniendo las secciones dos veces en xileno puro por 40 y 20 minutos respectivamente. Luego fueron pasados por una serie de alcoholes de concentraciones decrecientes y por ultimo por agua. Para llevar a cabo la recuperación antigénica, los vidrios fueron sumergidos en buffer citrato (10mM citrato de sodio, 1,9mM ácido cítrico, pH 6) durante 20 minutos a 95º. Se lavó tres veces con buffer tris salino (TBS; 50mM Tris-Cl pH 7,5, 150mM NaCl) y los vidrios fueron sumergidos en una solución conteniendo 3% peróxido de hidrogeno en metanol por 10 minutos para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Se lavó tres veces con TBS y se realizó el bloqueo, incubando con 5% de Normal Horse Serum (NHS) en TBST (0,5% Tween 20 en TBS) durante una hora. Se incubó con el anticuerpo primario (CYP46A1) en TBS durante toda la noche a 4º. Al día siguiente, se lavó tres veces con TBST y luego se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1 en 200 en TBS durante dos horas. Se lavó tres veces con TBS y se incubó con el complejo avidin-biotin-peroxidasa (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados con TBS y se incubó durante 7 minutos con una solución al 0.05% de 3-3-diamino-bencidina tetra clorhidrato (DAB, Sigma) y 0.01% de peróxido de hidrógeno en PBS. A continuación los vidrios se lavaron con agua destilada y luego fueron sumergidos en una serie de alcoholes de concentraciones crecientes y finalmente en xileno. Por último los cortes se cubrieron utilizando DPX (Fluka).

7.3. Inmunohistoquímica en secciones obtenidas mediante micrótomo de congelación y crióstato

El protocolo llevado a cabo tanto con los cortes realizados con micrótomo de congelación y crióstato fue el mismo, con la excepción de pequeñas variaciones en la técnica. En el caso de los cortes obtenidos mediante micrótomo de congelación, las secciones no fueron colocadas sobre vidrios gelatinizados sino que se sumergieron en PBS para luego llevar a cabo la técnica inmunohistoquímica por el método de “free floating”. Este método consiste en la incubación de las secciones de tejido con agitación en un recipiente que contienen las soluciones correspondientes. En el caso de los cortes obtenidos mediante criostato, estos si fueron colocados en vidrios gelatinizados, como se mencionó anteriormente, y luego se procedió con el protocolo descripto a continuación:

Las secciones fueron lavadas tres veces con PBS y luego se las incubó durante una hora con una solución conteniendo 10% de metanol y 3% peróxido de hidrogeno en PBS para eliminar la peroxidasa endógena. A continuación se lavó con PBS y se realizó el bloqueo con 5% Normal Horse Serum (NHS) y 0,3% Tritón-X100 en PBS durante una hora. Se incubó con el anticuerpo primario (CYP46A1 y β3 Tubulina) en una solución con 1% NHS y 0,2% Tritón-X100 en PBS durante toda la noche a 4º.

Al día siguiente, se lavó tres veces con PBS y luego se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado diluido en una solución con 1% de NHS en PBS durante dos horas. Se lavó nuevamente tres veces con PBS y se incubó con el complejo avidin-biotin-peroxidasa (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS y se incubó por 7 minutos en una solución conteniendo 0.05% de 3-3-diamino-bencidina tetra clorhidrato (DAB, Sigma) y 0.01% peróxido de hidrógeno en PBS.

Los cortes obtenidos mediante micrótomo de congelación se ordenaron anatómicamente en PBS y se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados, utilizando gelatina Albrecht como medio de montaje.

Tanto los cortes obtenidos mediante criostato como aquellos obtenidos mediante micrótomo de congelación se contratiñeron con Tinción de Nissl, utilizando como colorante Rojo Neutro (ver protocolo a continuación).

7.4. Técnica de Nissl

La técnica de Nissl permite colorear toda la población neuronal y es comúnmente

utilizada para reconocer estructuras del SNC.
Procedimiento: los vidrios fueron sumergidos en una serie de alcoholes de concentraciones decrecientes y luego en agua destilada durante dos minutos, a continuación se incubaron en una solución conteniendo 0,5% de Rojo Neutro y agua destilada por 3 minutos, se lavaron con agua destilada y se pasaron por una serie de alcoholes de concentraciones crecientes. Finalmente se sumergieron dos veces en xileno y se cubrieron con DPX.
Para homogeneizar las diferencias derivadas del procedimiento inmunohistoquímico, el mismo se realizó de a pares (un ratón joven y un ratón viejo al mismo tiempo).

7.5. Técnica Fluoro-Jade B

Las secciones obtenidas mediante micrótomo de congelación fueron colocadas en PBS, donde se las ordenó y luego montó en portaobjetos previamente gelatinizados utilizando agua destilada como medio de montaje. A continuación se las dejó secar en plancha a 42º durante dos días y luego se las sumergió en xileno durante 3 minutos. Posteriormente, los cortes fueron sumergidos en etanol 100%, etanol 80% y agua destilada, ambos durante dos minutos y luego se colocaron en una solución con 0,06% permanganato de potasio por 10 minutos, seguido de un lavado con agua destilada durante dos minutos e incubados por 20 minutos en una solución de 0,1% de ácido acético conteniendo 0,0004% de Fluoro-JadeB (Chemicon). Finalmente, los cortes se lavaron 3 veces con agua destilada durante un minuto y se colocaron en la plancha a 42º por un día. Luego fueron colocados en xileno y montados con DPX (Fluka).

8. TRANSFECCIÓN E INMUNOFLUORESCENCIA

8.1. Transfección de células en cultivo

Se transfectaron neuronas de 7 DIV con Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific), utilizando 3 plásmidos:
pCyp46-EGFP
pDEST40-mCherry-D4
pLV-eGFP
Todos fueron purificados utilizando Quiagen midiprep kit.

Las células fueron transfectadas con los plásmidos pDEST40-mCherry-D4 y pLV-eGFP en una relación 2:3 con un total de 5µg de ADN y pDEST40-mCherry-D4 y pCyp46-EGFP en la misma relación y cantidad de ADN, luego se incubaron durante 90 minutos con Opti-MEM (Gibco), se cambió el medio de cultivo por el que tenían originalmente (Neurobasal sumplementado con B27 y Glutamax) y al cabo de 24 horas las células fueron fijadas con 4% PFA en PBS a 37º durante 10 minutos. Finalmente se montaron utilizando Mowiol (12% glicerol, 4,8% Mowiol, 20% Tris buffer 100mM pH 8,5 en agua destilada).

8.2. Inmunofluorescencia

Las células fueron fijadas con 4% PFA en PBS a 37º durante 10 minutos, se realizaron 2 lavados con PBS durante 5 minutos y luego se permeabilizaron con 0,1% Tritón en PBS durante 10 minutos. A continuación, se realizaron 3 lavados con 0,1% Tween 20 en PBS por 5 minutos y se incubó con los anticuerpos primarios (CYP46, TAU 1 y MAP2) en 0,1% Tween 20 en PBS durante 1 hora. Se realizaron 2 lavados con 0,1% Tween 20 en PBS durante 5 minutos y luego se incubó con los anticuerpos secundarios (Alexa 633 cabra anti ratón, Alexa 488 cabra anti conejo) en 0,1% Tween 20 en PBS durante 1 hora. Luego, se realizaron 2 lavados con 0,1% Tween 20 en PBS durante 5 minutos, un lavado con PBS y por último un lavado con agua destilada. Los vidrios se montaron con Mowiol.

9. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN EGFP-D4

9.1. Preparación de bacterias competentes

Se prepararon bacterias competentes utilizando el protocolo descripto en el manual Molecular Cloning (Sambrook *et al*., 1989). Se seleccionó una colonia aislada de la cepa BL21(DE3)pLysS (*Escherichia coli*), y se realizó un cultivo durante una noche (cultivo overnight, ON) en 3ml de medio LB suplementado con Cloramfenicol (34 µg/ml). Al día siguiente, se tomó 1ml del cultivo y a partir de este se realizó otro mayor, de 100 ml, el cual se dejó incubar durante 3 horas con agitación constante y a 37º. Se controló la densidad óptica (OD_{600}) cada 20/30 minutos hasta llegar a un valor de 0,5. A continuación, el cultivo se enfrió colocándolo en hielo durante 10

minutos y se centrifugó a 4000rpm (centrífuga Beckman Coulter, rotor SX4750) por 10 minutos a 4°. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10ml de $CaCl_2$ 0.1M. Se centrifugó nuevamente a 4000rpm por 10 minutos a 4° y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 4ml de $CaCl_2$ 0.1M y luego se realizaron alícuotas conteniendo dimetilsulfóxido (DMSO - 280µl de DMSO cada 4ml de células resuspendidas), las cuales fueron almacenadas a -80º para su posterior uso.

9.2. Transformación de células competentes

Las células competentes de la cepa BL21(DE3)pLysS fueron transformadas con el plásmido pET-28-EGFP-D4 el cual codifica para la proteína de fusión de interés: EGFP-D4, para su sobreexpresión y posterior purificación. El protocolo llevado a cabo para la transformación de las bacterias fue el descripto por Sambrook *et al*., 1989. En detalle, se agregó 1µl de DNA a 200µl de bacterias competentes y se almacenó en hielo durante 30 minutos. A continuación, el tubo se colocó en baño termostático (modelo Masson- Vicking) a 42° por 90 segundos y rápidamente se colocó en hielo durante 1 minuto. Posteriormente se agregaron 800ml de LB y se dejó incubar durante 1 hora con agitación constante a 37° para expresar la resistencia al antibiótico. A partir de este cultivo, se sembró una placa conteniendo el antibiótico para el cual el plásmido porta resistencia, en este caso kanamicina (30 µg/ml) y se la incubó en estufa a 37º durante 15 horas aproximadamente.

9.3. Inducción de la expresión de EGFP-D4

Para la inducción de la expresión del gen que codifica para la proteína de fusión EGFP-D4, se seleccionó una colonia aislada y se realizó un cultivo ON utilizando 5ml de medio LB y kanamicina (30 µg/ml). Al día siguiente, los 5 ml se colocaron en un Erlenmeyer conteniendo 500 ml de LB y kanamicina (30 µg/ml) y se controló la densidad óptica (OD_{600}) cada 20/30 minutos hasta llegar a un valor de 0,2, momento en el cual se agregó isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG). Se probaron distintas condiciones hasta lograr las adecuadas para la inducción de la proteína, las cuales fueron: concentración final de IPTG: 0,5mM, tiempo de incubación: 3,30 horas, temperatura: 25º y agitación constante. Luego, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante.

9.4. Purificación de la proteína de fusión EGFP-D4

Para la purificación de la proteína, el pellet fue resuspendido en 10ml de Buffer nativo de lisis (50mM Buffer fosfato pH 8, 300mM NaCl, 10mM imidazole e inhibidores de proteasas) y se agregaron 600µl de lisozima (10mg/ml). Se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se utilizó un sonicador (Sonics VibraCell™) para lisar las células *E. coli* (durante 4 minutos, con 10 segundos de pulso, 6 segundos de pausa y una intensidad del 80%). Luego, se centrifugó durante 15 minutos a 4500rpm y se agregaron 10ml de Buffer nativo de lisis. Para el primer paso de purificación de la proteína de interés, los 10ml de buffer de lisis conteniendo las células lisadas se agregaron a 4ml de resina de Níquel (Ni^+-NTA agarose column chromatography, Invitrogen ProBond resin 460901), indicada para la purificación de aquellas proteínas que poseen cola de histidinas, como es el caso de EGFP-D4, y se dejó en agitación durante 1 hora a 4º. Luego de esto, se centrifugó por 3 minutos a 2600rpm, se descartó el sobrenadante, se agregaron 10ml de Buffer nativo de lisis y se centrifugó por 2 minutos a 2500rpm. A continuación, se descartó el sobrenadante y se realizaron 4 lavados utilizando Buffer nativo de lisis conteniendo 20mM de imidazole. Entre lavado y lavado se dejó incubar por 5 minutos con agitación constante a 4º y se centrifugó por 2 minutos a 2500rpm. Luego de descartar el sobrenadante del último lavado, se agregó 1ml de Buffer nativo de lisis incluyendo 20mM de imidazole, se resuspendió y se armó una columna dentro de una jeringa de 1,5ml. Finalmente, se agregó Buffer nativo de lisis incluyendo 250mM de imidazole, lo que permitió la elución de la proteína unida a la cola de histidinas que habían quedado pegada a la resina. Las eluciones se almacenaron a -70º con 10% de glicerol para favorecer la estabilidad de la proteína hasta continuar con el protocolo de purificación.

La fracción conteniendo la proteína parcialmente purificada se descongeló y se dializó con 20mM Tris/HCl pH 7,5 conteniendo 0,8M de $(NH_4)_2SO_4$ a 4º durante una noche. Al día siguiente la proteína dializada se agregó a 1,5ml de resina Octyl-sepharose (Octyl-sepharose 4 Fast Flow 17-0946-10, Amersham Pharmacia Biotech). Esta resina permite la purificación basada en las interacciones hidrofóbicas de la proteína con la matriz gelatinosa sin carga de la resina. Se realizaron varios lavados con 20mM Tris/HCl pH 7,5 conteniendo 0,8M de $(NH_4)_2SO_4$, y se eluyó con 20mM Tris/HCl pH 7,5 conteniendo 0,2M de $(NH_4)_2SO_4$.

La proteína purificada se dializó con buffer hepes salino pH 7 (1,6% NaCl, 0,074% KCl, 0,027% $Na_2HPO_4.2H_2O$, 0,2% Dextrosa, 1% Hepes) a 4º durante una noche y finalmente se liofilizó y cuantificó con el método de Lowry. La pureza de la proteína eluida fue chequeada mediante electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida.

9.5. Detección de colesterol en cultivo primario de neuronas hipocampales utilizando la proteína EGFP-D4

Para utilizar la proteína purificada EGFP-D4 como herramienta para detectar la distribución de colesterol en cultivo primario de neuronas hipocampales, se tomó como base el protocolo descripto para inmunofluorescencia: las células fueron fijadas con 4% PFA en PBS a 37º durante 10 minutos, se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos y luego se permeabilizaron con 0,1% Tritón en PBS durante 10 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos y luego se incubó con 0,8mM de EGFP-D4 en PBS durante 30 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos y por último un lavado con agua destilada. Los vidrios se montaron con Mowiol.

RESULTADOS

1. INMUNODETECCIÓN DE CYP46 EN CEREBROS DE RATONES JÓVENES Y VIEJOS

La calidad de las tinciones por inmunohistoquímica posee una gran variabilidad. Dependiendo de la proteína en estudio y del anticuerpo primario utilizado, la obtención de resultados concluyentes depende del método de fijación del tejido analizado, del procesamiento del tejido previo al corte y del grosor de las secciones de tejido utilizadas. Por lo tanto, en primer lugar se ensayaron diferentes estrategias a fin de seleccionar aquella metodología que permita identificar el protocolo más apropiado para la detección de CYP46 en cerebros de ratón.
Para esto, 3 cerebros de animales de prueba fueron perfundidos con una solución de paraformaldehído, los cerebros fueron removidos y para cada individuo los hemisferios fueron separados. Un hemisferio fue destinado para su inclusión en parafina mientras que el otro hemisferio fue equilibrado en 30% de sacarosa en agua. A continuación, tres técnicas distintas de corte de cerebros fueron comparadas:
i) los hemisferios incluidos en parafina fueron cortados en secciones de 10µm mediante micrótomo,
ii) los hemisferios equilibrados en 30% de sacarosa fueron cortados en secciones de 40µm utilizando un criostato o un micrótomo de congelación.

Una vez obtenidas las secciones sagitales de cerebro mediante cada una de estas tres técnicas, las mismas fueron utilizadas a fin de identificar la proteína CYP46 por inmunohistoquímica tal como se indica en Materiales y Métodos. Pudo observarse que la marca de CYP46 fue más clara y definida en aquellas secciones obtenidas mediante micrótomo de congelación y que fueron luego incubadas por el método “free floating”, por lo que esta técnica fue la seleccionada.

A continuación, 5 ratones jóvenes y 5 viejos fueron perfundidos tal como se indica en Materiales y Métodos. Luego los cerebros fueron procesados y cortados de acuerdo a la técnica seleccionada, a fin de analizar y comparar el patrón de expresión de

CYP46 en animales de ambas edades.

La inspección detallada de las secciones sagitales de cerebros permitió observar la tinción específica de CYP46 en somas y procesos (axones o dendritas) de neuronas piramidales de giro dentado, regiones CA3, CA2, CA1, y subículo dorsal de hipocampos de ratones jóvenes (Figura 4 A, Figura 5 A, C y E y Figura 6 A y C). Al analizar estas mismas regiones en secciones de cerebros de ratones viejos, se observó una marca mucho más intensa principalmente en somas de neuronas piramidales de CA3, CA2 y CA1, aunque la marca no fue evidente en los procesos de las células en estas regiones hipocampales (Figura 4 B, Figura 5 B, D y F y Figura 6 B y D). Además, se observó un claro aumento de los niveles de CYP46 en somas de neuronas pertenecientes al subículo dorsal (Figura 6 D).

Otra de las regiones donde se observó una fuerte tinción correspondiente a CYP46 fue en cerebelo. En ratones jóvenes, pudo apreciarse marca tanto en los somas como en los árboles dendríticos de células de Purkinje y en neuronas de la capa granular, probablemente células de Golgi (Ramirez *et al*., 2008) (Figura 7 A). En ratones viejos, las células de Purkinje se encontraron también fuertemente teñidas. Se observó además un aumento de intensidad en la marca de CYP46 en las células de la capa granular y en la capa molecular de esta región del cerebro (Figura 7 B).

Con respecto a la corteza cerebral, la marca de CYP46 se distribuyó a lo largo de las 6 capas de la misma, tal como se ha descripto previamente por Lund *et al*., 1999 para animales jóvenes (Figura 8 A). Se observó un claro aumento de los niveles de CYP46 en esta región en secciones de cerebros obtenidas a partir de ratones viejos (Figura 8 B).

Al analizar las secciones de cerebro de animales viejos, resulta particularmente llamativa la presencia de agregados con marca positiva para CYP46, distribuidos de manera uniforme por las distintas regiones del hipocampo (CA3, CA2, CA1, y subículo dorsal) (Figura 4 B, Figura 5 B, D y F y Figura 6 B y D, ver flechas negras) y en cerebelo, entre las capas de células de Purkinje y granular (Figura 7 B, ver flechas negras). La presencia de estos agregados se observó en las secciones provenientes de todos los ratones viejos, no así en jóvenes.

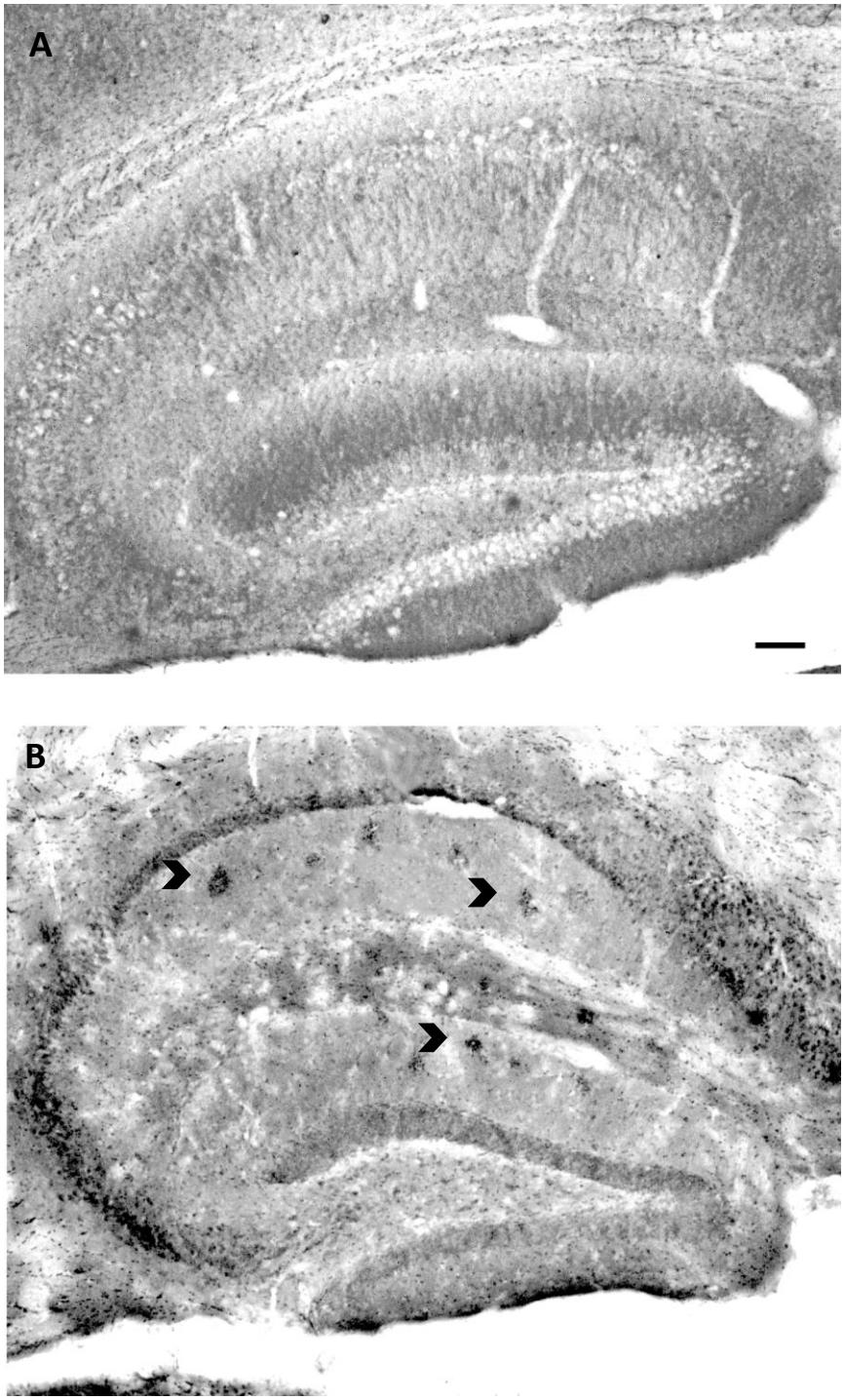


Figura 4: Expresión de CYP46 en hipocampo de ratones jóvenes (A) y viejos (B). Las secciones sagitales de 40µm fueron obtenidas con micrótomo de congelación y teñidas con un anticuerpo primario contra CYP46 y secundario conjugado a Peroxidasa. Los inmunocomplejos se visualizaron con DAB y se realizó contratinción con Nissl. Se observa un claro aumento en la marca de la enzima en el tejido perteneciente al animal viejo (B). Fotografías tomadas a un aumento de 5X. Las flechas negras señalan los agregados positivos de CYP46. Barra de escala de 100 µm. Lateral 1,44 mm.

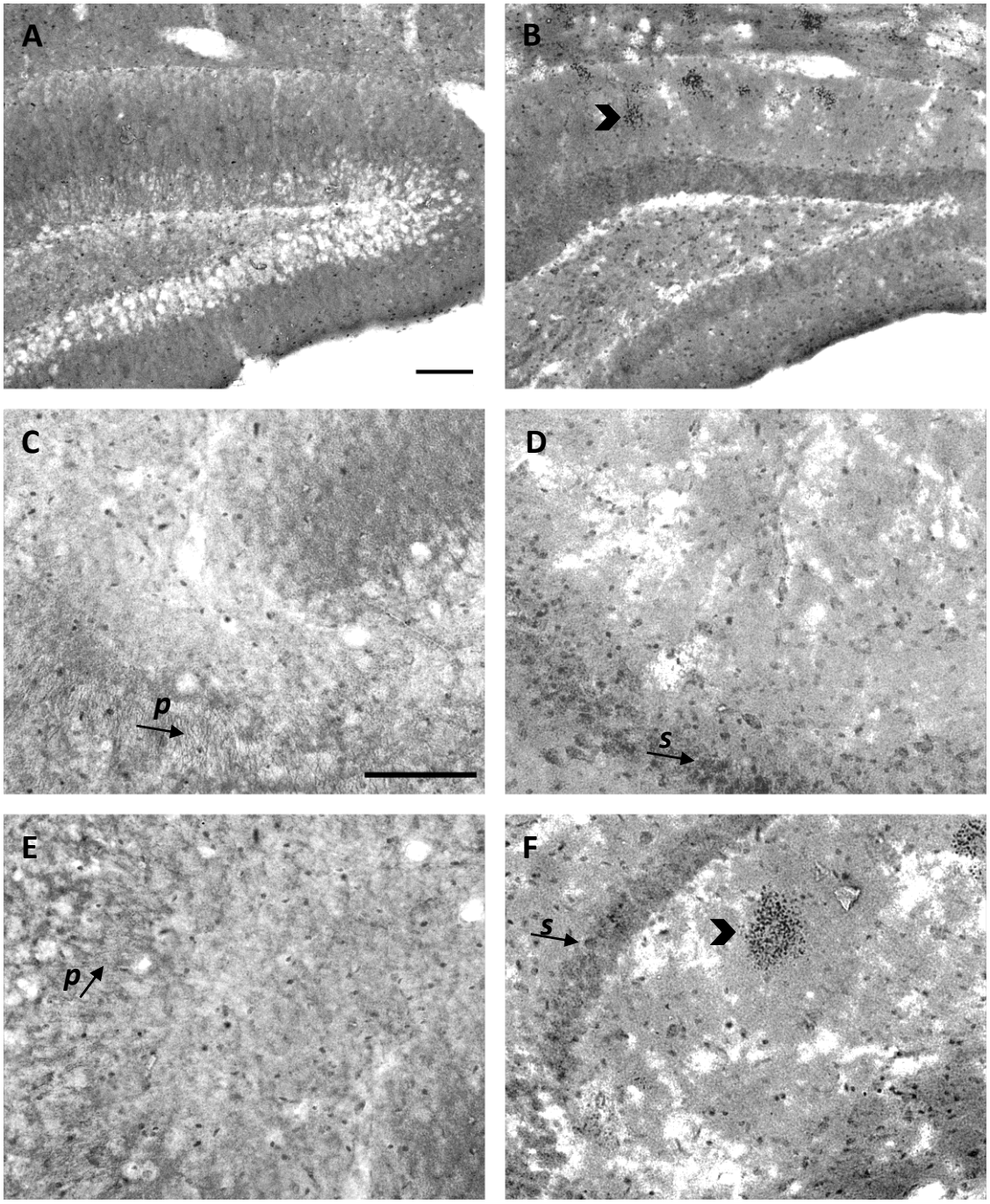


Figura 5: Expresión de CYP46 en hipocampo de ratones jóvenes (A, C y E) y viejos (B, D y F).
Las secciones sagitales de 40µm fueron obtenidas con micrótomo de congelación y teñidas con un anticuerpo contra CYP46. Los inmunocomplejos se visualizaron con DAB y se realizó contratinción con Nissl. Se observa un claro aumento en la marca de la enzima en las todas las áreas hipocampales pertenecientes al animal viejo (B, D y F).
Fotografías A y B tomadas a un aumento de 10X. Fotografías C-F tomadas a un aumento de 20X.
A y B: giro dentado
C y D: CA3
E y F: CA2
Las flechas negras señalan los agregados positivos de CYP46, *p*: procesos, *s*: somas.
Barra de escala de 100 µm.

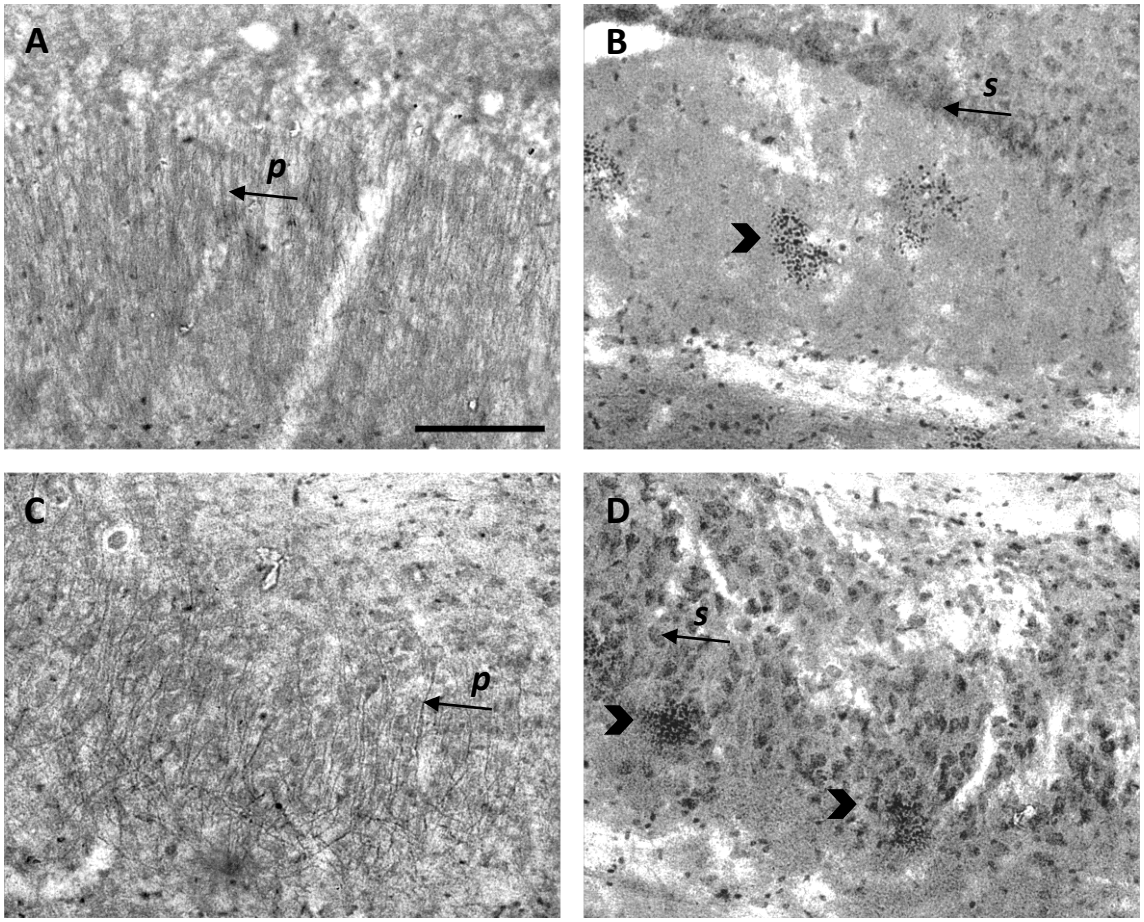


Figura 6: Expresión de CYP46 en hipocampo de ratones jóvenes (A y C) y viejos (B y D). Las secciones sagitales de 40µm fueron obtenidas con micrótomo de congelación y teñidas con un anticuerpo contra CYP46. Los inmunocomplejos se visualizaron con DAB y se realizó contratinción con Nissl. Se observa un claro aumento en la marca de la enzima en las todas las áreas hipocampales pertenecientes al animal viejo (B y D).
Fotografías tomadas a un aumento de 20X.
A y B: CA1
C y D: subículo dorsal
Las flechas negras señalan los agregados positivos de CYP46, *p*: procesos, *s*: somas.
Barra de escala de 100 µm.

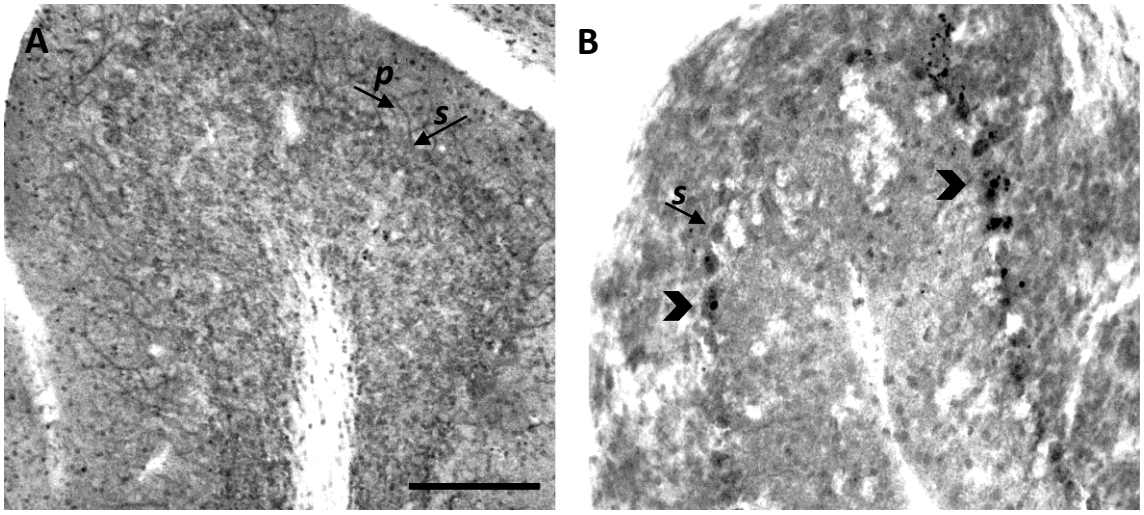


Figura 7: Expresión de CYP46 en el cerebelo de ratones jóvenes (A) y viejos (B).
Las secciones sagitales de 40µm fueron obtenidas con micrótomo de congelación y teñidas con un anticuerpo contra CYP46. Los inmunocomplejos se visualizaron con DAB y se realizó contratinción con Nissl. Se observa un claro aumento en la marca de la enzima en el tejido perteneciente al animal viejo (B). Las flechas negras señalan los agregados positivos de CYP46, *p*: procesos, *s*: somas. Fotografías tomadas a un aumento de 20X. Barra de escala de 100 µm.

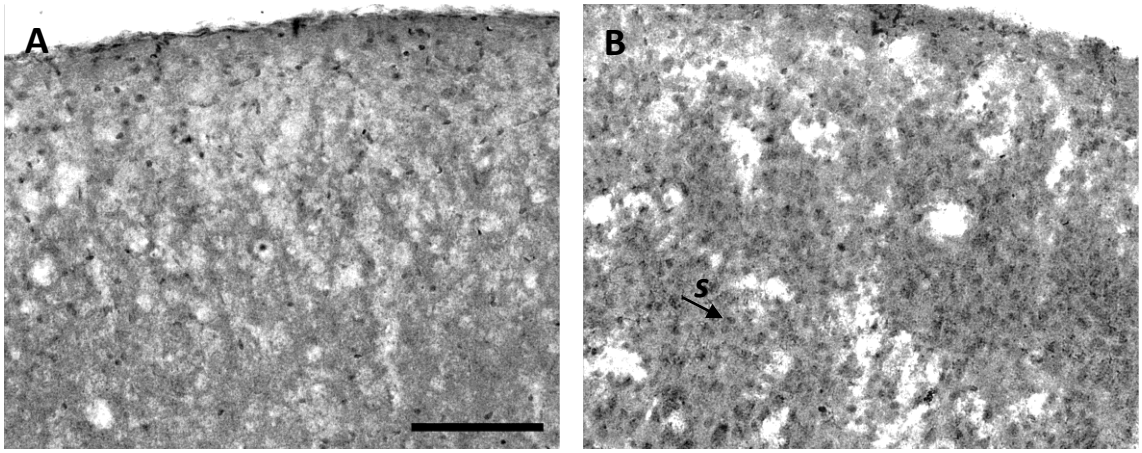


Figura 8: Expresión de CYP46 en corteza de ratones jóvenes (A) y viejos (B).
Las secciones sagitales de 40µm fueron obtenidas con micrótomo de congelación y teñidas con un anticuerpo contra CYP46. Los inmunocomplejos se visualizaron con DAB y se realizó contratinción con Nissl. Se observa un claro aumento en la marca de la enzima en el tejido perteneciente al animal viejo. *s*: somas. Fotografías tomadas a un aumento de 20X. Barra de escala de 100 µm.

2. INMUNODETECCIÓN DE B3 TUBULINA EN CEREBROS DE RATONES JÓVENES Y VIEJOS

A continuación, secciones de cerebro de los mismos animales jóvenes y viejos fueron teñidas para detectar β3 TUBULINA, un marcador específico neuronal. Esta proteína se distribuye en forma ubicua en cuerpo y procesos de estas células.
La tinción por inmunohistoquímica de la proteína β3 Tubulina se utilizó como control, principalmente por dos motivos fundamentales:
i) para comprobar la integridad de células neuronales en secciones de animales viejos.
ii) como un primer paso para descartar la posibilidad de que los agregados presentes en el tejido de animales viejos fuesen el resultado de un artefacto de la técnica histológica.

La marca obtenida con este anticuerpo fue comparable tanto para animales jóvenes y viejos, donde pudo apreciarse una clara tinción de cuerpos y procesos en todas las regiones estudiadas. Como puede apreciarse en las Figuras 9-13, la tinción para β3 Tubulina sugiere que los procesos neuronales se presentan intactos en animales viejos. Estos datos indican que la baja señal correspondiente a CYP46 identificada en procesos de neuronas viejas no parece deberse a la alteración del tejido durante el proceso de perfusión, fijado y corte.
Utilizando este anticuerpo anti β3 Tubulina no se observó la presencia de agregados en ninguna región del cerebro de animales viejos, sugiriendo que estos agregados serían específicos de CYP46.

Con el objeto de determinar si los agregados identificados con el anticuerpo anti CYP46 eran producto de la acumulación de células muertas, se llevó a cabo la técnica de Fluoro-jade B. Este compuesto posee afinidad por neuronas en estado degenerativo, incluyendo soma, dendritas y axones (Schmued *et al*., 2000). Sin embargo, el resultado fue negativo (no se encontraron células reactivas), sugiriendo que los agregados no están formados por restos de células muertas.

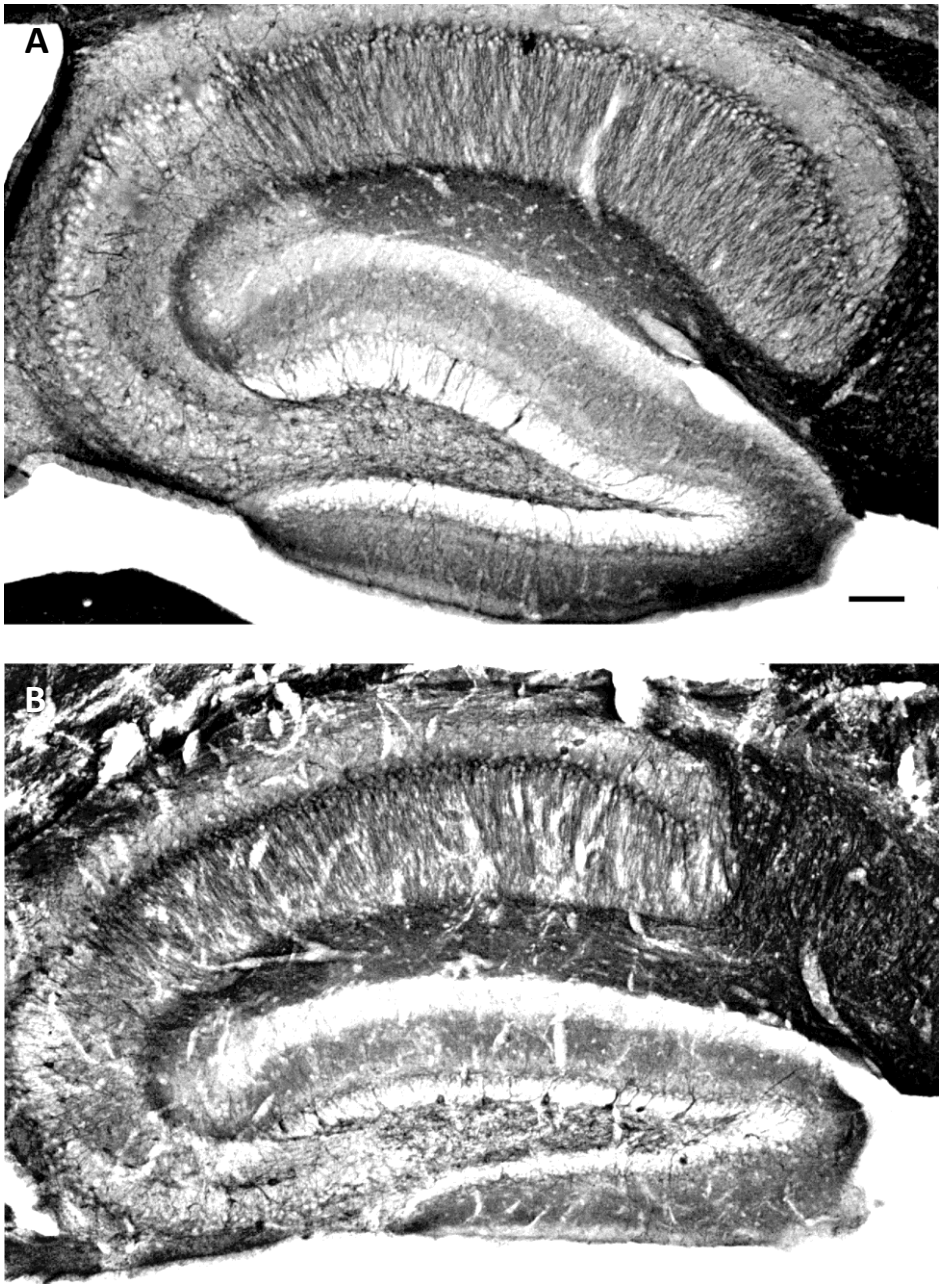


Figura 9: Expresión de β3 Tubulina en hipocampo de ratones jóvenes (A) y viejos (B). Las secciones sagitales de 40µm fueron obtenidas con micrótomo de congelación y teñidas con un anticuerpo contra β3 Tubulina. Los inmunocomplejos se visualizaron con DAB y se realizó contratinción con Nissl. Puede apreciarse una clara tinción de cuerpos y procesos en todas las regiones estudiadas tanto en A como en B. Fotografías tomadas a un aumento de 5X. Barra de escala 100 µm. Lateral 1,44 mm.

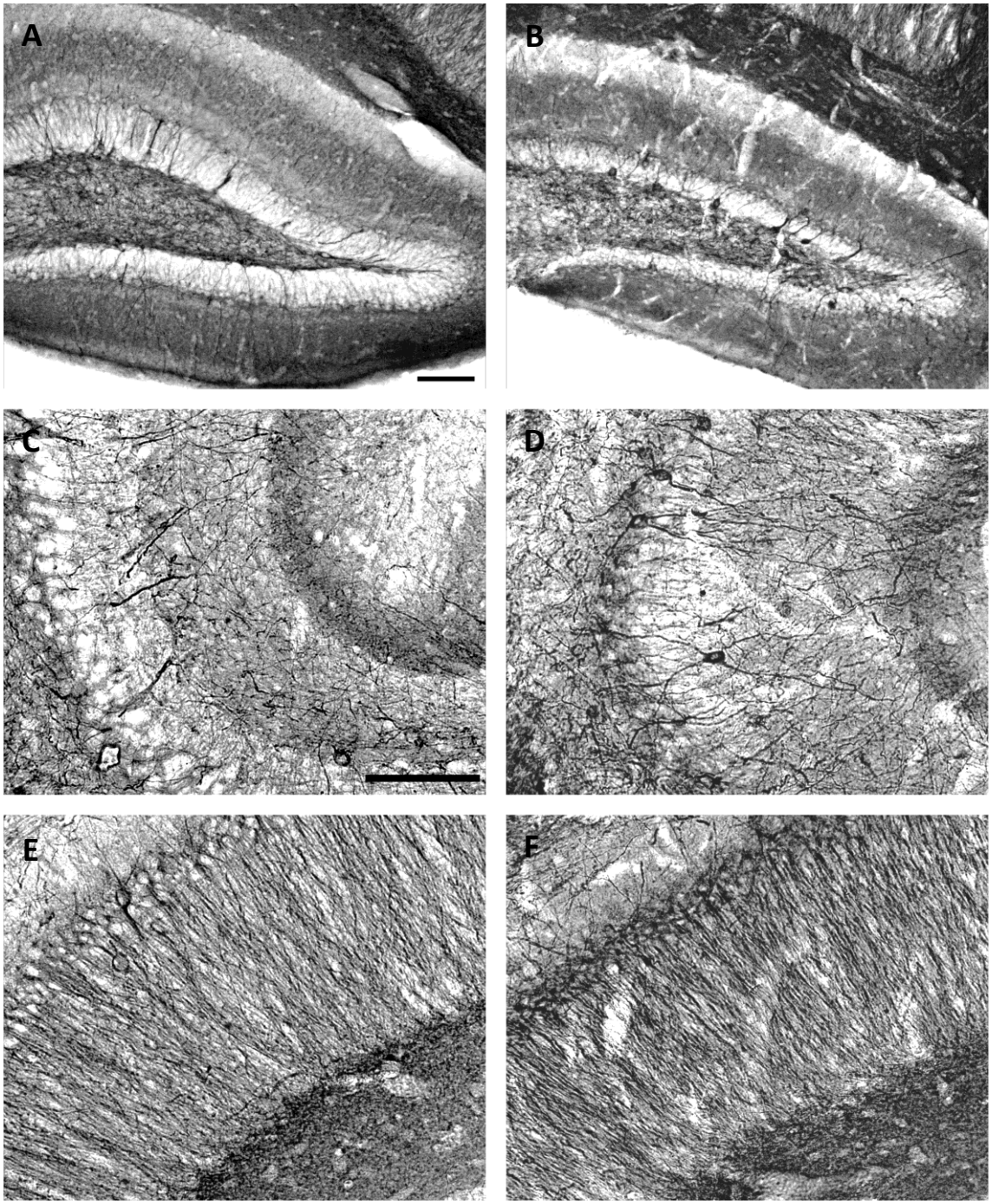


Figura 10: Expresión de β3 Tubulina en hipocampo de ratones jóvenes (A-E) y viejos (F-J).
Las secciones sagitales de 40µm fueron obtenidas con micrótomo de congelación y teñidas con un anticuerpo contra β3 Tubulina. Los inmunocomplejos se visualizaron con DAB y se realizó contratinción con Nissl.
Fotografías A y B tomadas a un aumento de 10X. Fotografías C-F tomadas a un aumento de 20X.
A y B: giro dentado
C y D: CA3
E y F: CA2
Barra de escala de 100 µm.

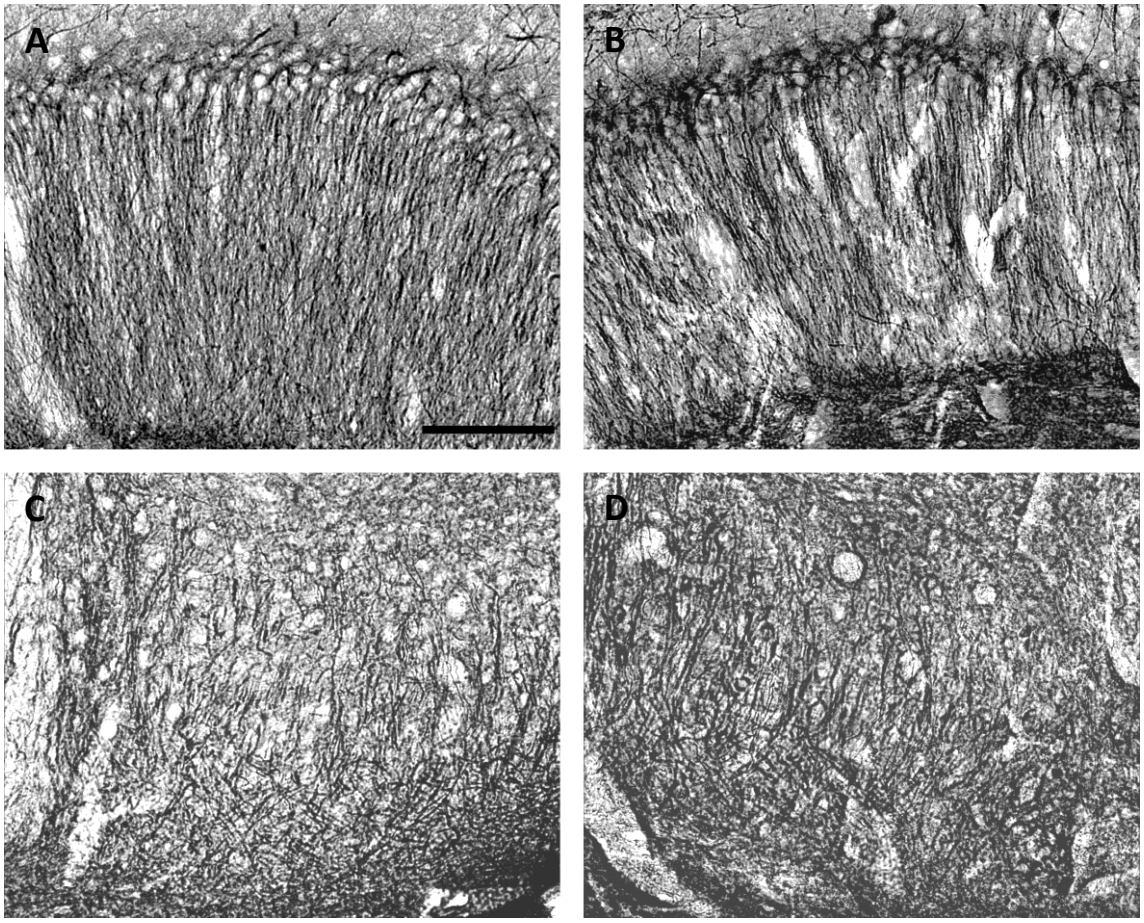


Figura 11: Expresión de β3 Tubulina en hipocampo de ratones jóvenes (A y C) y viejos (B y D).
Las secciones sagitales de 40µm fueron obtenidas con micrótomo de congelación y teñidas con un anticuerpo contra β3 Tubulina. Los inmunocomplejos se visualizaron con DAB y se realizó contratinción con Nissl. Fotografías tomadas a un aumento de 20X.
A y B: CA1
C y D: subículo dorsal
Barra de escala de 100 µm.

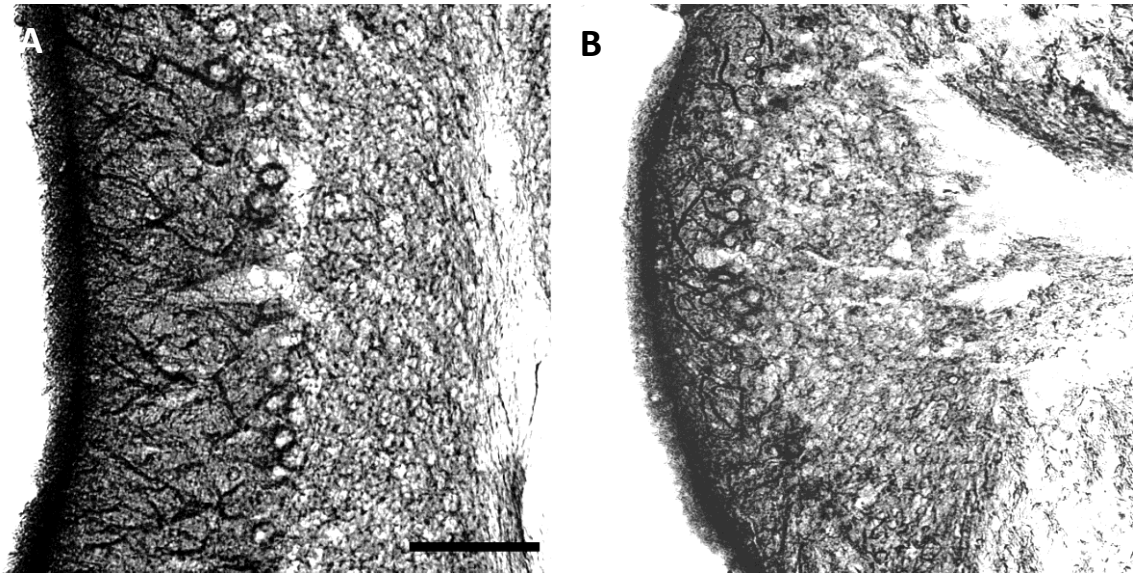


Figura 12: Expresión de β3 Tubulina en cerebelo de ratones jóvenes (A) y viejos (B). Las secciones de 40um fueron obtenidas con micrótomo de congelación y teñidas con un anticuerpo policlonal anti β3 Tubulina. Los inmunocomplejos se visualizaron con DAB y se realizó contratinción con Nissl. Fotografías tomadas a un aumento de 20X. Barra de escala de 100 µm.

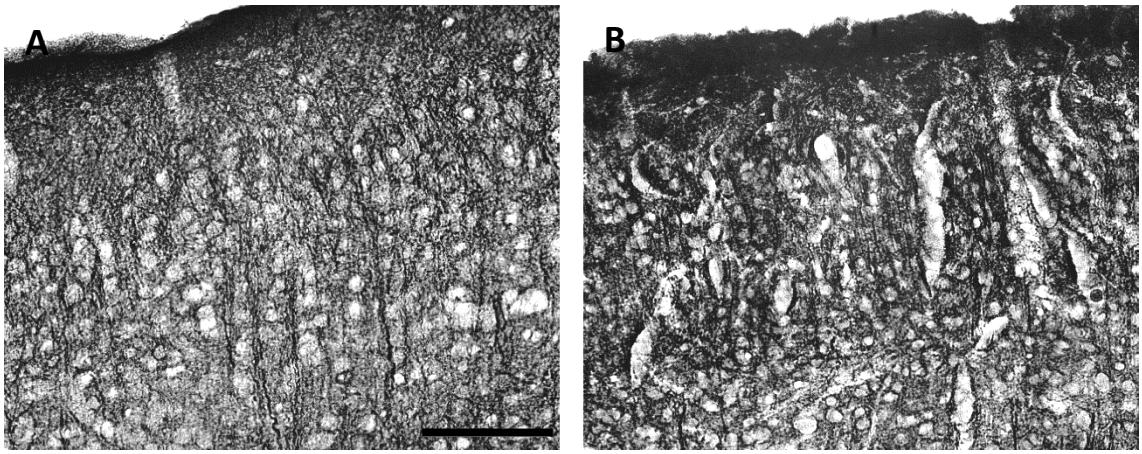


Figura 13: Expresión de β3 Tubulina en corteza de ratones jóvenes (A) y viejos (B). Las secciones sagitales de 40µm fueron obtenidas con micrótomo de congelación y teñidas con un anticuerpo contra β3 Tubulina. Los inmunocomplejos se visualizaron con DAB y se realizó contratinción con Nissl. Fotografías tomadas a un aumento de 20X. Barra de escala de100 µm.

3. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE CYP46

El siguiente objetivo de este trabajo fue el de analizar la localización subcelular de CYP46 en células que poseen altos niveles de esta enzima, tal como es el caso en neuronas viejas. Para esto se realizaron experimentos de inmunofluorescencia en cultivos primarios de neuronas hipocampales de embriones de rata.

En primer lugar se analizó la distribución intracelular de la proteína en neuronas mantenidas en cultivo durante 7 días *in vitro* (DIV), utilizando anticuerpos específicos para detectar CYP46, TAU1 (como marcador de axones) y MAP2 (como marcador de dendritas). Como puede observarse en las Figuras 14 y 15, la tinción de CYP46 arrojó un patrón punteado, no homogéneo, que concuerda con la localización de la enzima en retículo endoplásmico (Ramirez *et al*., 2008).

En trabajos previos, Ramírez *et al*. (2008) han descripto que la localización subcelular de CYP46 en cultivos primarios de neuronas hipocampales es somato-dendrítica, indicando además que esta proteína se encuentra ausente en axones y en terminales presinápticas. Sin embargo, a diferencia de estas observaciones, nuestros resultados muestran que la proteína CYP46 endógena colocaliza con el marcador axonal TAU1 (Figura 15). Además, como puede apreciarse en la Figura 14, la marca correspondiente a CYP46 se encuentra presente en aquellos procesos excluídos por la marca de MAP2 (axones).

Por lo tanto, a diferencia de lo descripto por Ramírez *et al*., 2008, nuestros resultados muestran que en cultivos de neuronas hipocampales de rata, CYP46 no solo se encuentra localizada en soma y dendritas sino también en los axones de estas células.

Posteriormente, para analizar la distribución de CYP46 en células que presentan altos niveles de esta proteína, se transfectaron neuronas de 7 DIV con el plásmido pCyp46-EGFP, el cual permite la sobreexpresión del gen *cyp46A1* bajo el control de un promotor constitutivo. La localización subcelular de CYP46 en estas células se analizó mediante inmunofluorescencia utilizando además los anticuerpos primarios anti TAU1 y anti MAP2.

El análisis de las imágenes de microscopía confocal obtenidas a partir de estas células muestran claramente que CYP46 se encuentra presente tanto en somas como en dendritas y axones (Figura 16 y 17), confirmando lo observado anteriormente con niveles endógenos de la enzima.

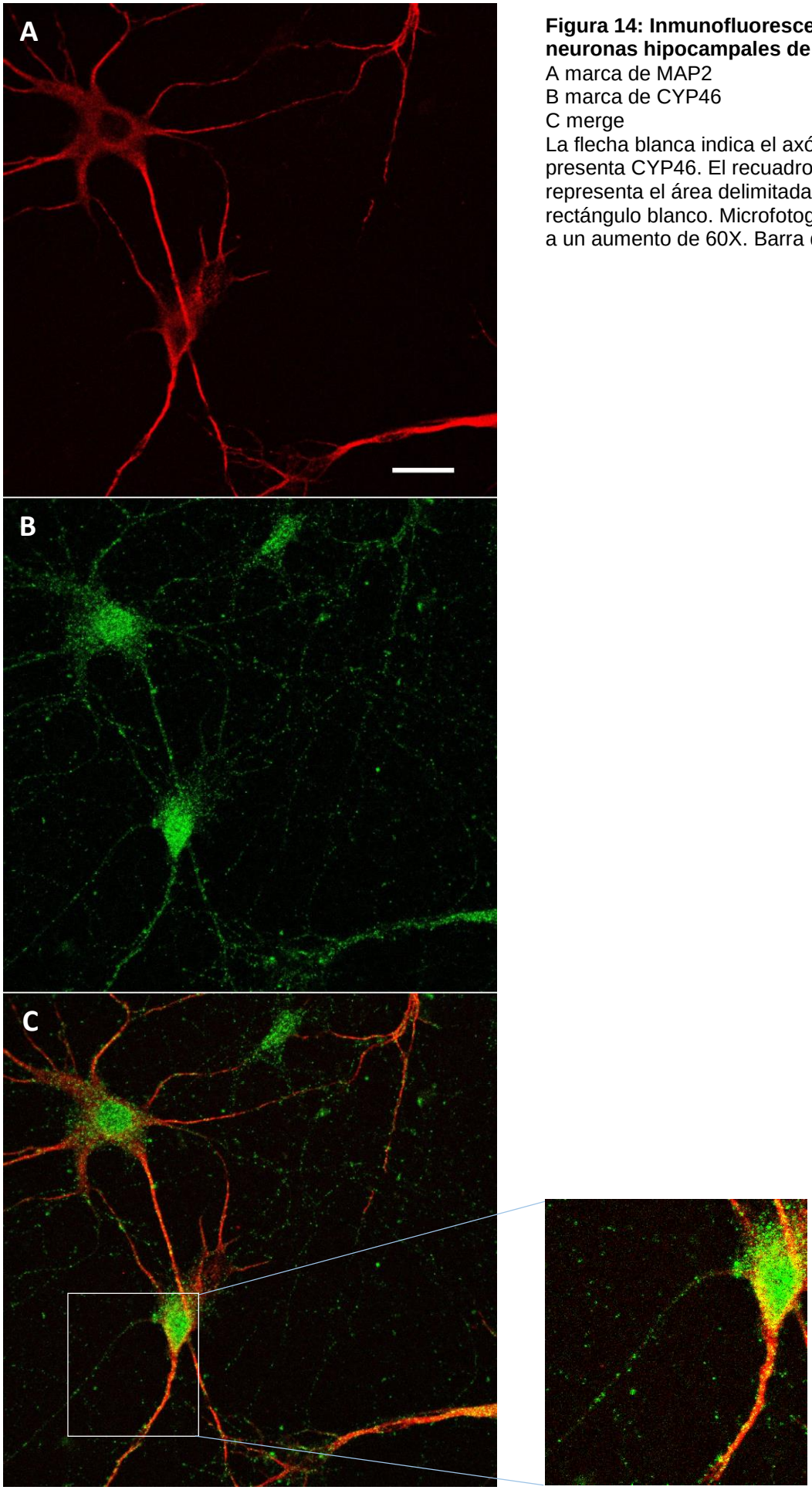


Figura 14: Inmunofluorescencia en neuronas hipocampales de 7 DIV.
A marca de MAP2
B marca de CYP46
C merge
La flecha blanca indica el axón, el cual presenta CYP46. El recuadro de la derecha representa el área delimitada con el rectángulo blanco. Microfotografías tomadas a un aumento de 60X. Barra de escala: 20µm

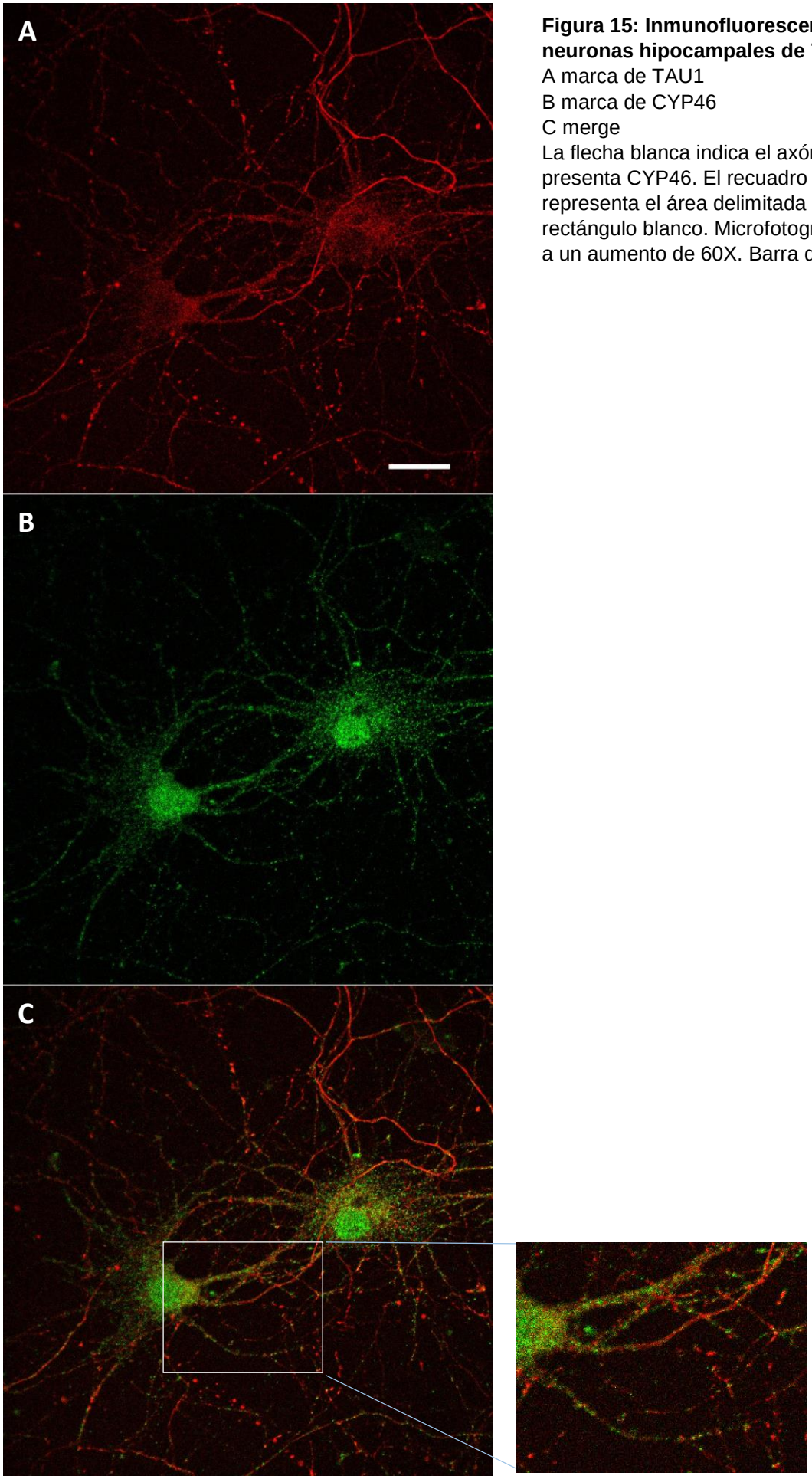


Figura 15: Inmunofluorescencia en neuronas hipocampales de 7 DIV.
A marca de TAU1
B marca de CYP46
C merge
La flecha blanca indica el axón, el cual presenta CYP46. El recuadro de la derecha representa el área delimitada con el rectángulo blanco. Microfotografías tomadas a un aumento de 60X. Barra de escala: 20µm

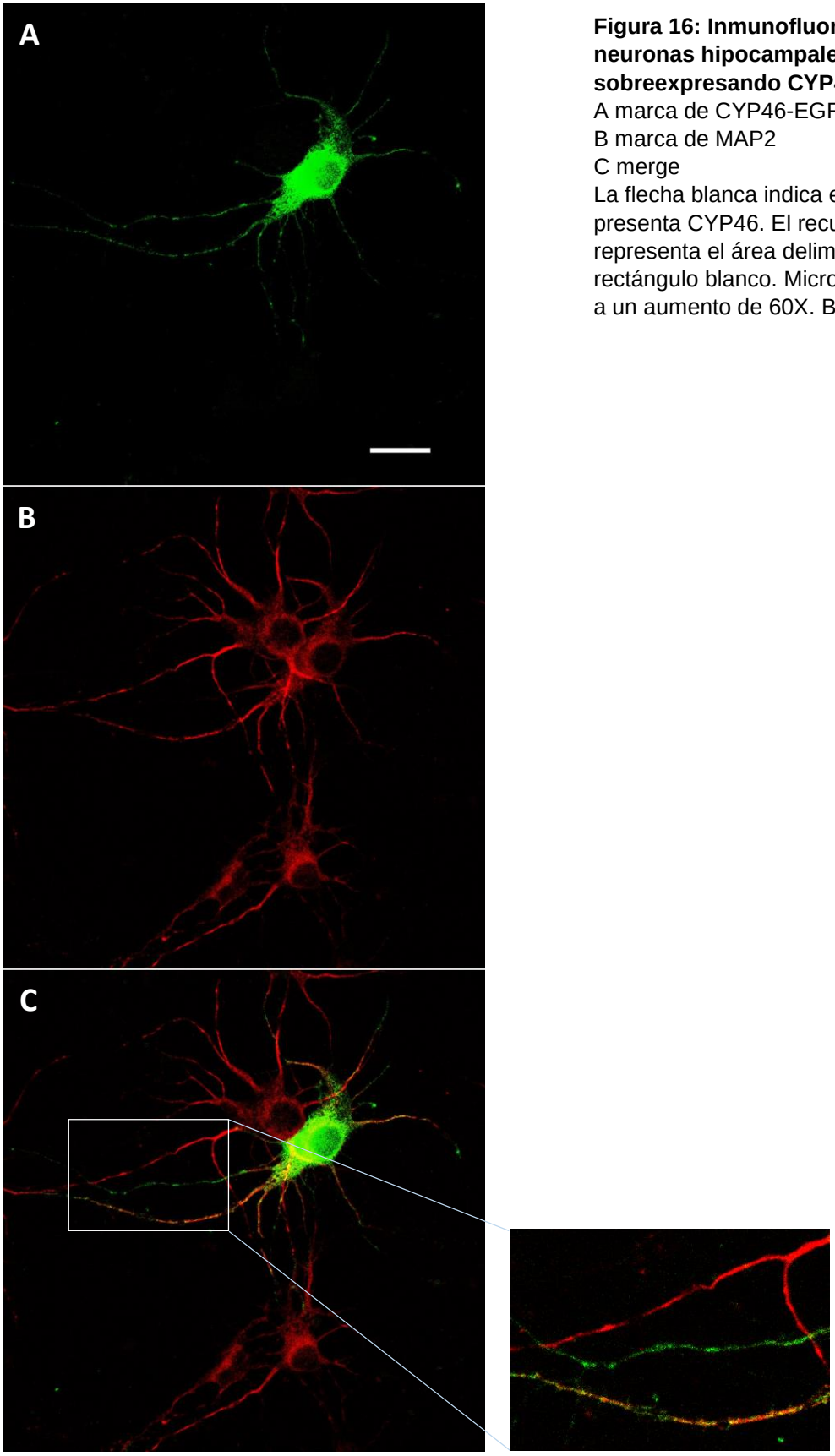


Figura 16: Inmunofluorescencia en neuronas hipocampales de 7 DIV sobreexpresando CYP46-EGFP.
A marca de CYP46-EGFP
B marca de MAP2
C merge
La flecha blanca indica el axón, el cual presenta CYP46. El recuadro de la derecha representa el área delimitada con el rectángulo blanco. Microfotografías tomadas a un aumento de 60X. Barra de escala: 20µm

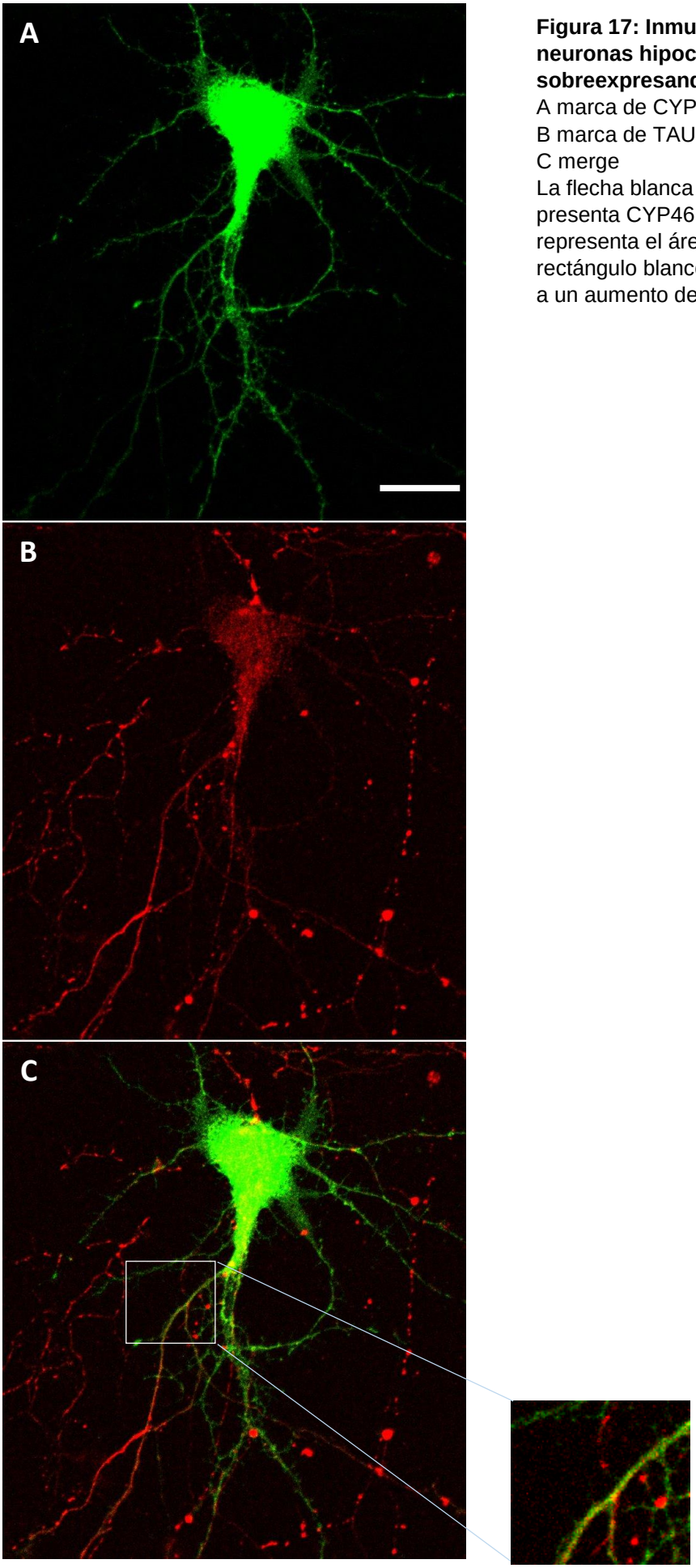


Figura 17: Inmunofluorescencia en neuronas hipocampales de 7 DIV sobreexpresando CYP46-EGFP.
A marca de CYP46-EGFP
B marca de TAU1
C merge
La flecha blanca indica el axón, el cual presenta CYP46. El recuadro de la derecha representa el área delimitada con el rectángulo blanco. Microfotografías tomadas a un aumento de 60X. Barra de escala: 20µm

4. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA LA DETECCIÓN DE COLESTEROL EN CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS HIPOCAMPALES

El siguiente objetivo de este trabajo fue el de optimizar una herramienta que permita detectar la distribución de colesterol en neuronas hipocampales de rata en cultivo.

Para cumplir con este objetivo, se procedió a la transfección de estas neuronas hipocampales con el plásmido pDEST40-mCherry-D4. Este plásmido permite la expresión del gen que codifica para una proteína de fusión entre el dominio D4 la perfringolisina O de *Clostridium perfringens* (Shimada *et al*., 2002) y la proteína fluorescente roja mCherry. El dominio D4 posee la capacidad de unirse a colesterol con gran especificidad (Abe *et al*., 2012), por lo tanto, la proteína mCherry-D4 sintetizada intracelularmente constituye una sonda fluorescente capaz de identificar los dominios ricos en colesterol en células vivas (Shimada *et al*., 2002; Abe *et al*., 2012).

En primer lugar, neuronas de 7 DIV fueron transfectadas con el plásmido pDEST 40 mCherry-D4 y analizadas por microscopía confocal 24 hs posteriores al tratamiento. Dado que la señal emitida por la proteína mCherry-D4 posee una intensidad media, estas neuronas fueron co-transfectadas con el plásmido pLV-eGFP que dirige la síntesis de eGFP soluble. Esto permitió la fácil identificación de las células transfectadas. Como puede apreciarse en la Figura 18, la proteína mCherry-D4 se distribuye intracelularmente de acuerdo a un patrón reticular que concuerda con el perfil de distribución de colesterol (Brachet *et al* 2016).

Con el objeto de determinar cuáles son las regiones subcelulares en las cuales se produce una pérdida de colesterol como consecuencia de altos niveles de CYP46, neuronas hipocampales de 7 DIV fueron co-transfectadas con los plásmidos pCyp46-EGFP y pDEST40-mCherry-D4.

Como puede observarse en la Figura 19, la presencia de altos niveles de CYP46 produjo una dramática reducción en la marca correspondiente a mCherry-D4. Al

cuantificar y comparar la intensidad de fluorescencia de mCherry-D4 entre las neuronas con niveles endógenos de CYP46 y aquellas transfectadas con el plásmido pCyp46-EGFP, pudimos comprobar que el aumento en los niveles de CYP46 llevaba a una notable reducción de más de un 80% en la señal correspondiente a mCherry-D4 (Figura 20). Esta considerable caída de la marca de mCherry-D4, indicaría una disminución en el colesterol a niveles que se encuentran por debajo del rango fisiológico, lo cual sería inviable para la sobrevida neuronal. De acuerdo al trabajo de Brachet *et al*., 2016, la reducción de colesterol podría llevar a una agregación de la proteína mCherry-D4 por interacción entre sus dominios D4. Por lo tanto, esta herramienta no parece ser adecuada para determinar la reducción en los niveles de colesterol neuronal.

Como alternativa a la síntesis intracelular de mCherry-D4 como marcador de colesterol, se decidió utilizar a la proteína EGFP-D4 purificada como sonda fluorescente en un protocolo similar al de inmunofluorescencia. Para esto, el gen que codifica para la proteína de fusión EGFP-D4 fue sobreexpresado en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS y la proteína fue purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de Níquel (ver Materiales y Métodos).

Una vez obtenida la proteína pura, ésta fue utilizada como sonda para para marcar colesterol en neuronas hipocampales en cultivo previamente fijadas. Como puede observarse en la Figura 21, esta sonda permitió en principio, marcar las regiones de la célula enriquecidas en colesterol.

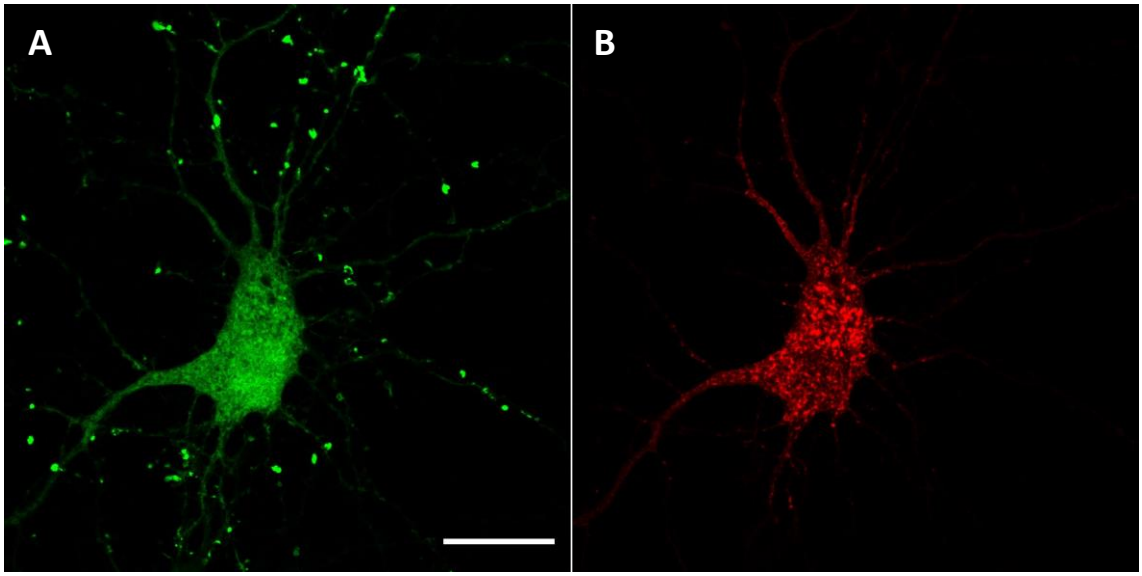


Figura 18: Distribución de colesterol en neuronas hipocampales de 7 DIV transfectadas con pLV-eGFP y pDEST40-mCherry-D4.
A eGFP
B mCherry-D4.
Microfotografías tomadas a un aumento de 60X. Barra de escala de 20µm.

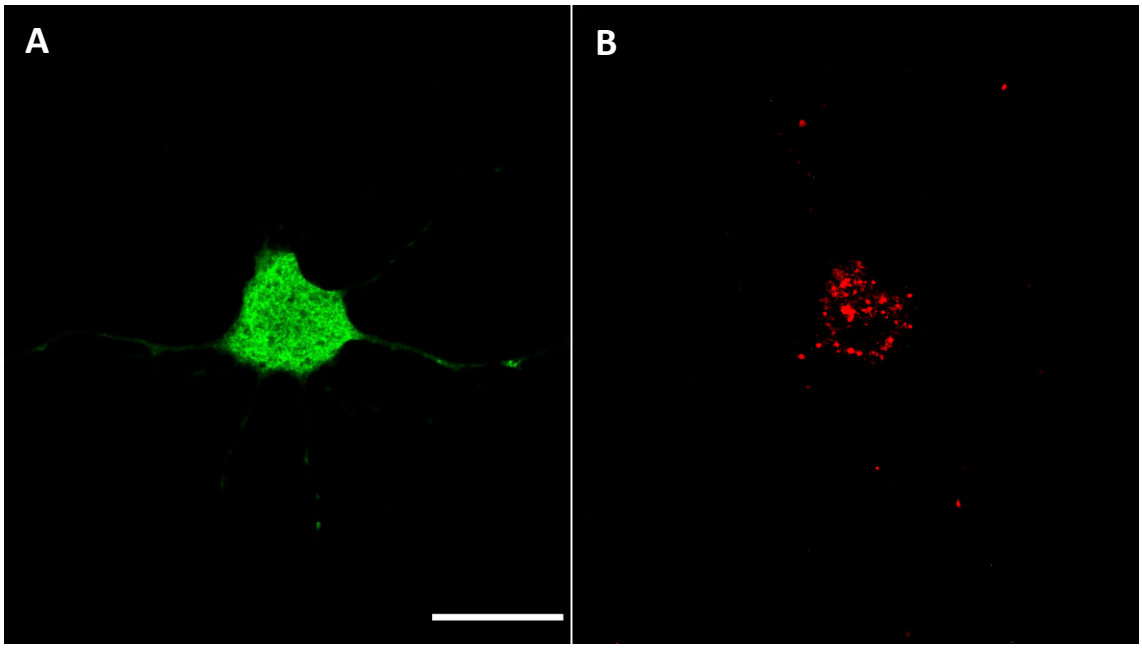


Figura 19: Distribución de colesterol en neuronas hipocampales de 7 DIV transfectadas con pCyp46-EGFP y pDEST40-mCherry-D4.
A CYP-EGFP
B mCherry-D4.
Microfotografías tomadas a un aumento de 60X. Barra de escala de 20µm.

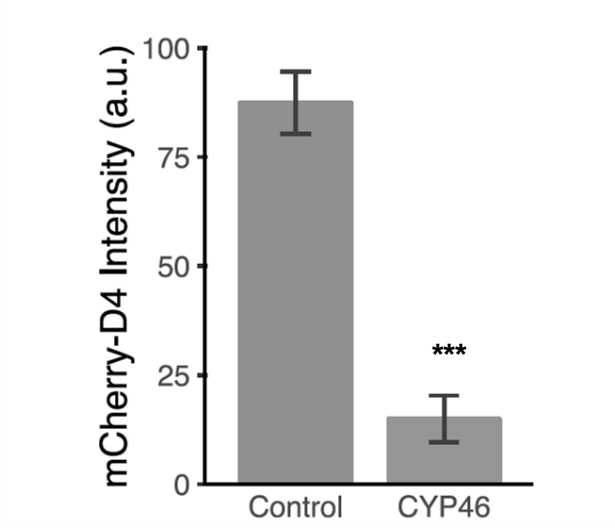


Figura 20: Cuantificación de intensidad de fluorescencia de mCherry-D4. El valor de p fue obtenido mediante un test T de student, valor p=0,001. La barra de error muestra los valores de las medias +/- s.e.m.

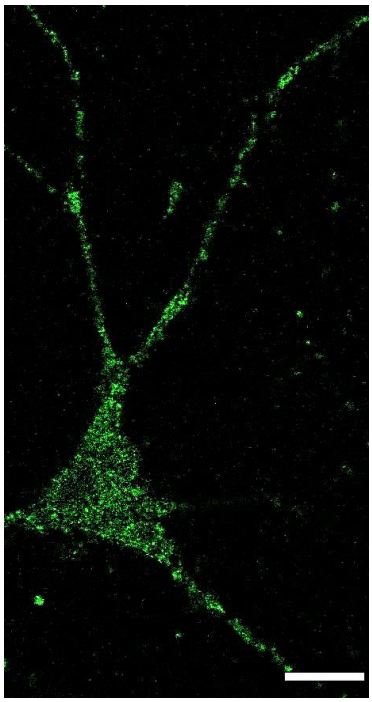


Figura 21: Distribución de colesterol en neuronas hipocampales de 7 DIV, detectado con la sonda EGFP-D4.
Microfotografías tomadas a un aumento de 60X. Barra de escala de 10µm.

DISCUSIÓN

En el envejecimiento no patológico no se produce muerte neuronal, pero si una disminución de la función de estas células, lo que lleva a que procesos tales como aprendizaje y memoria se vean afectados por la edad.

Muchos de los lípidos más importantes del cerebro sufren cambios significativos en sus concentraciones relativas y distribución a lo largo de la vida, sobre todo durante el envejecimiento (Martín *et al*., 2014b). En la mayoría de los casos estas alteraciones lipídicas han sido relacionadas a la aparición de problemas cognitivos, tanto en envejecimiento regular como patológico (Ledesma *et al*., 2012; Martín *et al*., 2010; Bertram *et al*., 2002).

La actividad de receptores neuronales es muy sensible a su entorno lipídico y uno de los cambios lipídicos que tiene mayor efecto en la estructura de las membranas celulares es el cambio en el contenido de colesterol. Como comentábamos anteriormente en la Introducción, la reducción de colesterol durante el envejecimiento ha sido descripta en neuronas hipocampales de ratón (Martin *et al*., 2008; Sodero *et al*., 2011), en hipocampo o corteza de ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer (Xie *et al*., 2003) y en muestras humanas de cerebros sanos o con diagnóstico de Alzheimer (revisado en Martín *et al*., 2014b).

En trabajos previos del laboratorio se ha demostrado que la pérdida de colesterol asociada al envejecimiento en neuronas hipocampales interfiere con la difusión lateral y endocitosis de receptores neuronales (principalmente receptores AMPA) así como también en la activación de receptores NMDA, lo cual es indispensable para la inducción de procesos celulares que subyacen a la formación de memoria (Collingridge *et al*., 2010; Ge *et al*., 2010). En concordancia con estos resultados, se ha demostrado que el agregado de colesterol permite rescatar parámetros electrofisiológicos y defectos cognitivos asociados a la edad *in vitro* e *in vivo* (Martin *et al*., 2014; Palomer *et al*., 2016).

La disminución en los niveles de colesterol es provocada por un aumento de los niveles de la enzima colesterol-24-hidroxilasa o CYP46. En trabajos previos se ha demostrado que existe un aumento del 50% en los niveles de expresión del gen *cyp46A1* durante el envejecimiento en neuronas hipocampales (Martin *et al*., 2008; Sodero *et al*., 2011) aunque hasta el momento no se han descripto en detalle aquellas áreas cerebrales en las cuales los niveles de CYP46 se encuentran incrementados en animales viejos.

En este trabajo de Tesina nos propusimos identificar en forma detallada las regiones del cerebro donde se produce un aumento en los niveles de CYP46 con el envejecimiento.

Para comenzar con esta caracterización, realizamos en primer lugar experimentos de inmunohistoquímica en secciones sagitales de cerebro de ratones jóvenes (3 a 5 meses) y viejos (20 a 24 meses), a fin de comparar la marca correspondiente a CYP46. Nuestros resultados permitieron identificar un claro aumento en los niveles de CYP46 en hipocampo (CA3, CA2, CA1 y subículo; Figuras 4, 5 y 6), cerebelo (Figura 7) y corteza (Figura 8) en secciones obtenidas a partir de animales viejos.

En hipocampo, este incremento de CYP46 fue evidente sobre todo en los somas neuronales, a diferencia de lo observado en muestras de animales jóvenes, donde puede apreciarse marca tanto en somas como en procesos. Esto nos llevó a suponer que, dado que los tejidos cerebrales de animales viejos presentan mayor fragilidad, éstos podrían haberse visto alterados durante el proceso de preparación de las muestras para inmunohistoquímica, impidiendo detectar la marca en procesos neuronales. Sin embargo, las tinciones realizadas con anticuerpos anti β3 Tubulina, localizada en forma ubicua en células neuronales, permitieron identificar esta proteína en procesos de neuronas viejas y comprobar la integridad de los mismos en las secciones de cerebros de animales de 20 meses (Figuras 9 - 13). Por lo tanto nuestros resultados sugieren que la proteína CYP46 se acumularía principalmente en somas de neuronas viejas.

El aumento de los niveles de CYP46 observado en hipocampo y corteza, se condice con lo descripto en trabajos previos, en donde se ve una clara disminución de los niveles de colesterol en estas mismas áreas (Tabla 1, Ledesma *et al*., 2012). Todas estas regiones y particularmente el hipocampo, están fuertemente ligadas al aprendizaje y formación de memoria.

El cerebelo está también involucrado en estos procesos, y varios trabajos han descripto la relación entre esta estructura y procesos cognitivos (Jacobs *et al*., 2017). En nuestros resultados vimos un notable aumento en la marca de CYP46 en esta estructura en las secciones pertenecientes a animales viejos, al compararlo con secciones de animales jóvenes. Sin embargo, aún no se ha estudiado si el cerebelo de animales viejos presenta una disminución en los niveles de colesterol, por lo que estos estudios serán planteados entre nuestros próximos objetivos.

Es sabido que durante el envejecimiento se produce la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) conduciendo a la generación de estrés oxidativo (OS). Se ha demostrado que ciertas regiones cerebrales, en particular las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, y células de la capa granular del cerebelo son más sensibles al OS en comparación con otras áreas del cerebro (Wang *et al*., 2005). Trabajos publicados previamente a este trabajo de Tesina han demostrado que el OS contribuye al aumento de actividad transcripcional del gen *cyp46a1* (Ohyama *et al*., 2006; Sodero *et al*., 2011), por lo que el notable aumento observado en los niveles de CYP46 en hipocampo y cerebelo concuerda con una mayor respuesta a estrés oxidativo en estas regiones.

Al analizar los resultados de inmunohistoquímica, resultó llamativa la presencia de agregados positivos para CYP46 en las secciones pertenecientes a ratones viejos. Dado que la tinción de secciones de animales viejos con Fluoro Jade B, que permite identificar neuronas en degeneración y muerte neuronal (Schmued *et al*., 2000), dio resultados negativos, esto sugiere que los agregados identificados con el anticuerpo anti CYP46 no corresponderían a acumulaciones de células muertas.

La ausencia de estos agregados en tinciones realizadas con un anticuerpo contra β3 Tubulina permite especular que estos agregados sería específicos de

CYP46, sin embargo, esta hipótesis debe confirmarse realizando tinciones contra otras proteínas neuronales, así como también utilizando un anticuerpo anti CYP46 diferente.

En trabajos previos (Cartagena *et al*., 2008, Bogdanovic *et al*., 2001) se ha descripto que tanto luego de una lesión en el sistema nervioso central, como en cerebros extraídos de pacientes con Alzheimer, la enzima CYP46 se encuentra presente en células gliales (microglía y astrocitos respectivamente), a pesar de que en condiciones normales solo se encuentra presente en neuronas (Pfrieger and Ungerer, 2011). De acuerdo con los resultados obtenidos en estos trabajos, es posible que los agregados positivos de CYP46 encontrados en el tejido de los animales viejos estén formados (al menos en parte) por glía reactiva. Es por esto que, a futuro nos proponemos dilucidar la naturaleza de estos agregados, utilizando marcadores de glía, como por ejemplo GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein).

Otro de los objetivos de este trabajo fue el de analizar la localización subcelular de la proteína CYP46. En trabajos previos, Ramirez *et al*. (2008) han descripto que CYP46 se encuentra presente en soma y dendritas, no así en axones ni en terminales presinápticas. Al realizar inmunofluorescencia en cultivo primario de neuronas hipocampales de 7 DIV utilizando un anticuerpo anti CYP46 y marcadores de dendritas (MAP2; Figura 14) y axones (TAU1; Figura 15), pudimos observar la presencia de marca correspondiente a CYP46 en soma, dendritas y también en axones, aunque en este último caso, en menor intensidad. Es probable que la menor intensidad de la señal en axones se deba a que estos procesos poseen un calibre mucho menos que las dendritas, por lo que haya resultado más difícil identificar la marca positiva para CYP46.

Luego, analizamos la distribución subcelular de CYP46 en neuronas que sobreexpresan esta proteína. Para esto transfectamos neuronas de 7 DIV con el plásmido pCyp46-EGFP y analizamos la localización de la enzima utilizando nuevamente anticuerpos anti MAP2 (Figura 16) y TAU1 (Figura 17). Pudimos identificar la presencia de CYP46 en somas, dendritas y axones, confirmando lo visto anteriormente.

La disminución del colesterol en el hipocampo durante el envejecimiento produce efectos negativos tanto en la pre sinapsis como en la post sinapsis. Se ha visto que en terminales presinápticas, los bajos niveles de colesterol interfieren con la exocitocis de vesículas sinápticas y por lo tanto con la liberación de neurotransmisores (Linetti *et al*., 2010). Estos resultados indican que la disminución de colesterol en terminales presinápticas podría deberse al aumento de CYP46 en axones, por lo tanto tiene sentido que la enzima se encuentre presente en estos procesos, como pudimos observar en nuestros resultados.

Con el objeto de visualizar la distribución del colesterol en neuronas hipocampales, nos propusimos optimizar una herramienta para detectar este lípido. Para esto, contamos con dos proteínas de fusión: mCherry-D4 y EGFP-D4, las cuales contienen el dominio D4 de la perfringolisina O de *Clostridium perfringens* (Shimada *et al*., 2002). Este dominio posee la capacidad de unirse a colesterol con gran especificidad. En primer lugar, transfectamos neuronas con el plásmido pDEST40-mCherry-D4 para expresar la proteína de fusión mCherry-D4 (Figura 18), sin embargo, al sobreexpresar CYP46 observamos una caída del 80% en la marca de mCherry-D4 al compararla con la marca en neuronas con niveles normales de CYP46 (Figura 19 y 20). Esto significaría una disminución de los niveles de colesterol fuera del rango fisiológico, lo que sería perjudicial para la sobrevida neuronal. Nuestros datos sugieren que ante un aumento de CYP46, la proteína mCherry-D4 sufriría de un proceso de agregación y posterior degradación por el proteasoma, llevando a una sobreestimación de la caída de niveles de colesterol. Por lo tanto, esta herramienta no parece ser adecuada para determinar la reducción en los niveles de colesterol neuronal.

Por otro lado, la proteína de fusión EGFP-D4 purificada previamente fue utilizada como sonda para para marcar colesterol en neuronas hipocampales de 7 DIV previamente fijadas (Figura 21). La sonda permitió en principio, identificar las regiones de la célula enriquecidas en colesterol, sin embargo, no pudimos comprobar si es útil para marcar colesterol en condiciones de sobreexpresión de CYP46, ya que el plásmido pCyp46-EGFP (que nos permite sobreexpresar CYP46), al igual que la proteína de fusión EGFP-D4 presentan fluorescencia verde, por lo que no seriamos capaces de distinguir las marcas. En el futuro nos proponemos construir

una fusión CYP46-mCherry lo que nos permitiría detectar conjuntamente CYP46 y colesterol, y así visualizar la distribución de este lípido en células con elevados niveles de CYP46.

En conclusión, a partir de los datos anteriormente expuestos podemos afirmar que el envejecimiento lleva a un aumento en los niveles de la enzima CYP46 en aquellas áreas del cerebro donde se expresa en animales jóvenes. El aumento en los niveles de CYP46 en hipocampo y corteza concuerda con la disminución de los niveles de colesterol en estas zonas. El aumento de CYP46 también se observó en cerebelo, por lo tanto, es probable que el colesterol disminuya también en esta estructura.

Un aspecto a tener en cuenta es que no solo los niveles de colesterol se ven alterados durante el envejecimiento, sino que hay otros lípidos que también experimentan variaciones en sus niveles y que probablemente afecten de distintas maneras a la función del cerebro envejecido.

BIBLIOGRAFÍA

Mitsuhiro Abe, Asami Makino, Françoise Hullin-Matsuda, Keiju Kamijo, Yoshiko Ohno-Iwashita, Kentaro Hanada, Hideaki Mizuno, Atsushi Miyawaki and Toshihide Kobayashia (2012). A Role for Sphingomyelin-Rich Lipid Domains in the Accumulation of Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate to the Cleavage Furrow during Cytokinesis. 0270-7306. 2012. Molecular and Cellular Biology.

Stefanie Kaech & Gary Banker. Culturing hippocampal neurons. Nature Protocols (2007).

Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of the aging neuronal membrane. Neurobiol Aging. 2002. 23(5):843-53.

E.M. Blalock, K.C. Chen, K. Sharrow, J.P. Herman, N.M. Porter, T.C. Foster, P.W. Landfield, Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment, J. Neurosci. 23 (2003) 3807–3819.

Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalusy U, Lannfelt L, Winblad B, Russell DW, Björkhem I (2001) On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer’s disease. Abnormal induction of the cholesterol catabolic enzyme CYP46 in glial cells. Neurosci Lett 314: 45 – 48

Anna Brachet,1 Stephanie Norwood,1 Jos F. Brouwers,2 Ernest Palomer,1 J. Bernd Helms,2 Carlos G. Dotti,1 and José A. Esteban1. LTP-triggered cholesterol redistribution activates Cdc42 and drives AMPA receptor synaptic delivery. 2016. J. Cell Biol. Vol. 208 No. 6 791–806.

G. Bu, E.A. Maksymovitch, J.M. Nerbonne, A.L. Schwartz, Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons, J. Biol. Chem. 269 (1994) 18521–18528.

James Brown, Catherine Theisler, Simone Silberman, Debra Magnuson, Numa Gottardi-Littell, John M. Lee, Debra Yager, Janet Crowley, Kumar Sambamurti, Mohammad M. Rahman, Allison B. Reiss, Christopher B. Eckman, and Benjamin Wolozin (2004). Differential Expression of Cholesterol Hydroxylases in Alzheimer's Disease.

Cartagena CM, Ahmed F, Burns MP, Pajoohesh-Ganji A, Pak DT, Faden AI, Rebeck GW. Cortical injury increases cholesterol 24S hydroxylase (Cyp46) levels in the rat brain. 2008. J Neurotrauma 25:1087 – 1098.

Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT. Long-term depression in the CNS. Nat Rev Neurosci. 2010. 11: 459 – 473.

Crook T, Bartus RT, Ferris SH, Whitehouse P, Cohen GD and Gershon S. Age associated memory impairment: Proposed diagnostic criteria and measures of clinical change. Dev. Neuropsychol. 1986. 2: 261–276.

Ge Y, Dong Z, Bagot RC, Howland JG, Phillips AG, Wong TP, Wang YT. Hippocampal long term depression is required for consolidatiopn of spatial memory. Proc Natl Acad Sci USA. 2010. 107: 16697 – 16702.

T.H. Haines, Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? Prog. Lipid Res. 40 (2001) 299–324.

U. Igbavboa, N.A. Avdulov, S.V. Chochina, W.G. Wood, Transbilayer distribution of cholesterol is modified in brain synaptic plasma membranes of knockout mice deficient in the low-density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins, J. Neurochem. 69 (1997) 1661–1667.

Heidi I. L. Jacobs,1,2,3 David A. Hopkins,4,5 Helen C. Mayrhofer,2 Emiliano Bruner,6 Fred W. van Leeuwen,4 Wijnand Raaijmakers3 and Jeremy D. Schmahmann7. The cerebellum in Alzheimer's disease: evaluating its role in cognitive decline. 2017. doi:10.1093/brain/awx194.

J.J. Kabara, A critical review of brain cholesterol metabolism, Prog. Brain Res. 40 (1973) 363–382.

Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice. Tiina J. Kotti*, Denise M. O. Ramirez*, Brad E. Pfeiffer†‡, Kimberly M. Huber†‡, and David W. Russell*§

Ledesma MD, Martin MG, Dotti CG. Lipid changes in the aged brain: effect on synaptic function and neuronal survival. Prog Lipid Res. 2012. 51(1):23-35.

Linetti A, Fratangeli A, Taverna E, Valnegri P, Francolini M, Cappello V, Matteoli M, Passafaro M, Rosa P (2010) Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. J Cell Sci 123: 595 – 605

Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. 1999. Proc Natl Acad Sci USA 96: 7238 – 7243

Martin M, Dotti CG, Ledesma MD. Brain cholesterol in normal and pathological aging. Biochim Biophys Acta. 2010. 1801(8):934-44.

Martin MG, Ahmed T, Korovaichuk A, Venero C, Menchón S, Salas I, Munck S, Herreras O, Balschun D and Dotti CG. Constitutive hippocampal cholesterol loss underlies poor cognition in old rodents. EMBO Mol Med. 2014a. 6(7):902-17.

Martin MG, Perga S, Trovo L, Rasola A, Holm P, Rantamaki T, Harkany T, Castren E, Chiara F and Dotti CG. Cholesterol loss enhances TrkB signaling in hippocampal neurons aging in vitro. Mol Biol Cell. 2008. 19: 2101-2112.

Martín MG, Pfrieger F, Dotti CG. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. EMBO Rep. 2014b. 15(10):1036-1052.

H. Matthies Jr., S. Schulz, V. Hollt, M. Krug, Inhibition by compactin demonstrates a requirement of isoprenoid metabolism for long-term potentiation in rat hippocampal slices, Neuroscience 79 (1997) 341–346.

Ohyama Y1, Meaney S, Heverin M, Ekström L, Brafman A, Shafir M, Andersson U, Olin M, Eggertsen G, Diczfalusy U, Feinstein E, Björkhem I. Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes. J Biol Chem. 2006. 281(7): 3810-20.

Palomer E, Martín-Segura A, Baliyan S, Ahmed T, Balschun D, Venero C, Martin MG*, Dotti CG*. 2016. Aging Triggers a Repressive Chromatin State at Bdnf Promoters in Hippocampal Neurons. Cell Rep. Sep 13;16(11):2889-900.

Pfrieger FW, Ungerer N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. 2011. Prog Lipid Res 50: 357 – 371

Ramirez DM1, Andersson S, Russell DW. Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. J Comp Neurol. 2008. 507(5):1676-93.

M. Runquist, I. Parmryd, A. Thelin, T. Chojnacki, G. Dallner, Distribution of branch point prenyltransferases in regions of bovine brain, J. Neurochem. 65 (1995) 2299–2306.

J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Schmued and Bowyer, 1997. Methamphetamine exposure can produce neuronal degeneration in mouse hippocampal remnants.

K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1 (2000) 31–39.

Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G (1990) Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. J Neuro- chem 54: 415 – 423

Sodero AO, Trovò L, Iannilli F, Van Veldhoven P, Dotti CG and Martin MG. Regulation of tyrosine kinase B activity by the Cyp46/cholesterol loss pathway in mature hippocampal neurons: relevance for neuronal survival under stress and in aging. J Neurochem. 2011. 116(5):747-55.

Svennerholm L, Bostrom K, Helander CG, Jungbjer B (1991) Membrane lipids in the aging human brain. J Neurochem 56: 2051 – 2059

Thelen KM, Falkai P, Bayer TA, Lütjohann D (2006) Cholesterol synthesis rate in human hippocampus declines with aging. Neurosci Lett 403: 15–19

W.G. Wood, F. Schroeder, N.A. Avdulov, S.V. Chochina, U. Igbavboa, Recent advances in brain cholesterol dynamics: transport, domains, and Alzheimer's disease, Lipids 34 (1999) 225–234.

High intrinsic oxidative stress may underlie selective vulnerability of the hippocampal CA1 region Xinkun Wanga, Ranu Palb, Xue-wen Chenc, Nanteetip Limpeanchobb, Keshava N. Kumara,b, Elias K. Michaelisa,b,*. 2005. Molecular Brain Research 140 (2005) 120 – 126.

Y. Zhang, E.L. Appelkvist, K. Kristensson, G. Dallner, The lipid compositions of different regions of rat brain during development and aging, Neurobiol. Aging 17 (1996) 869–875.

AGRADECIMIENTOS

A Mauricio, mi director, por permitirme formar parte de su proyecto de investigación, por su buena predisposición y confianza.

A mis compañeros de laboratorio, Flor, Seba y Viqui, por ayudarme siempre y por las risas compartidas.

A todos los que forman parte del Instituto Ferreyra, que siempre que tuve una duda supieron ayudarme. En especial a Sole de Olmos, por enseñarme todo lo relacionado a inmunohistoquímica y por su generosidad en cuanto a los materiales y el espacio que me hicieron falta para llevar a cabo estos experimentos. A Emi, por ayudarme con el análisis estadístico y con las fotos.

A mi Tribunal de Tesina que de manera altruista formaron parte de este proceso y me obsequiaron parte de sus horas.

A mis compañeros de la facu, con los que pude formar un gran y hermoso grupo, especialmente Maku, Maca, Sofi y Viqui. Sin ellos el transcurso de esta carrera no hubiese sido el mismo. A mis amigas de toda la vida, Gre y Juli.

A la educación pública argentina.

A mis hermanos, a Javier, a mi papá.

A mi mamá, por todo.