



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Regulación de la formación de especies reactivas de oxígeno por la cadena respiratoria mitocondrial en células neurales

Tesis Doctoral

Irene López Fabuel

Director:

Prof. Dr. D. Juan Pedro Bolaños Hernández

Salamanca, 2015



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Juan Pedro Bolaños Hernández, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca,

Autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**Regulación de la formación de especies reactivas de oxígeno por la cadena respiratoria mitocondrial en células neurales**", que ha sido realizada bajo mi dirección por la Licenciada en Biotecnología Dña. Irene López Fabuel, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, de la Universidad de Salamanca. En mi opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendida y optar al Título de Doctor Internacional.

Salamanca, a 17 de Julio de 2015



Fdo.: Juan Pedro Bolaños Hernández

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción | 1 |
| 1. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS): efímeras moléculas señalizadoras | 3 |
| 1.1 Sitios de producción de ROS | 6 |
| 1.1.1 NADPH oxidasas | 6 |
| 1.1.2 Xantina oxidasa | 6 |
| 1.1.3 Dopamina | 6 |
| 1.1.4 α -Ketoglutarato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa | 7 |
| 1.1.5 Cadena respiratoria mitocondrial | 7 |
| 1.1.5.1 Complejo I | 8 |
| 1.1.5.2 Complejo II | 8 |
| 1.1.5.3 mGPDH | 9 |
| 1.1.5.4 ETF | 9 |
| 1.1.5.5 Complejo III | 9 |
| 1.2 Señalización a través de ROS | 10 |
| 1.3 ROS y enfermedades neurodegenerativas | 11 |
| 1.3.1 Enfermedad de Alzheimer | 12 |
| 1.3.2 Enfermedad de Parkinson | 12 |
| 1.3.3 Esclerosis lateral amiotrófica | 12 |
| 1.3.4 Enfermedad de Huntington | 13 |
| 1.3.5 Isquemia/reperfusión | 13 |
| 1.3.6 Terapias con antioxidantes | 13 |
| 2. Complejo I | 14 |
| 2.1 Estructura y ensamblaje | 17 |
| 2.2 Generación de $O_2^{\cdot -}$ por el complejo I | 18 |
| 3. Supercomplejos | 19 |
| 3.1 Factores involucrados en la estabilización de los supercomplejos | 21 |
| 3.1.1 Contenido lipídico | 21 |
| 3.1.2 Potencial de membrana | 21 |
| 3.1.3 Modificaciones postraduccionales | 21 |
| 3.1.4 Forma de la membrana interna | 21 |
| 3.2 Mecanismos de ensamblaje | 22 |
| 3.2.1 Factores de ensamblaje | 22 |
| 3.3 Supercomplejos y ROS | 23 |
| 4. Composición celular del cerebro | 24 |
| 4.1 Neuronas | 24 |
| 4.2 Astrocitos | 24 |
| 4.3 Oligodendrocitos | 25 |
| 4.4 Microglia | 25 |
| 4.5 Acoplamiento metabólico entre neuronas y astrocitos | 26 |
| 4.5.1 Lanzadera de lactato | 26 |
| 4.5.2 Ciclo glutamato-glutamina | 26 |
| 4.5.3 Antioxidantes | 26 |
| 2. Hipótesis y Objetivos | 29 |

| | |
|---|----|
| 1. Animales | 35 |
| 2. Cultivos Primarios | 35 |
| 2.1 Neuronas Corticales | 35 |
| 2.2 Astrocitos Corticales | 36 |
| 2.3 Cocultivos de Neuronas y Astrocitos Corticales | 37 |
| 3. Transfecciones Celulares | 38 |
| 3.1 Sobreexpresiones | 38 |
| 3.2 Silenciamientos mediante siRNA | 38 |
| 4. Tratamientos Celulares | 39 |
| 5. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno | 39 |
| 5.1 Peróxido de Hidrógeno | 39 |
| 5.1.1 H ₂ O ₂ en trozos de gel | 39 |
| 5.2 Superóxido | 39 |
| 6. Determinación del Potencial de Membrana Mitocondrial | 40 |
| 7. Estudios <i>ex vivo</i> | 40 |
| 7.1 Disgregación tisular y selección de células Integrina-β5 ⁺ | 41 |
| 7.2 Disgregación tisular en cerebros marcados con GFP | 41 |
| 8. Inmunofluorescencia | 42 |
| 8.1 Inmunocitoquímica | 42 |
| 8.2 Inmunohistoquímica | 42 |
| 9. Determinación de la concentración proteica | 43 |
| 10. Determinación de la actividad específica de enzimas mitocondriales | 43 |
| 10.1 Complejo I | 44 |
| 10.2 Complejo II | 44 |
| 10.3 Complejo II-III | 45 |
| 10.4 Complejo IV | 45 |
| 10.5 Citrato Sintasa | 46 |
| 11. Purificación y solubilización mitocondrial | 46 |
| 11.1 Centrifugación Diferencial | 47 |
| 11.2 Gradiente de Percoll | 47 |
| 11.3 Solubilización | 47 |
| 12. Respiración mitocondrial | 48 |
| 13. Lisis celular | 48 |
| 14. Electroforesis y transferencia tipo Western | 48 |
| 14.1 SDS-PAGE | 48 |
| 14.2 BNGE | 50 |
| 14.3 2D SDS-PAGE | 50 |
| 14.4 Transferencia directa BNGE | 50 |
| 15. Medida de la actividad del complejo I en gel | 50 |
| 16. Electroelución de proteínas | 51 |
| 17. Análisis proteico mediante Espectrometría de Masas | 51 |
| 18. Purificación de RNA | 53 |
| 19. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real | 53 |
| 20. Análisis estadístico | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Resultados | 57 |
| 1. La producción de especies reactivas de oxígeno es mayor en astrocitos que en neuronas y presenta un origen mitocondrial | 59 |
| 1.1 <i>In vitro</i> | 59 |
| 1.1.1 Medida de la producción de H ₂ O ₂ en célula entera | 50 |
| 1.1.2 Medida de la producción de H ₂ O ₂ en mitocondrias aisladas | 60 |
| 1.1.3 Medida de O ₂ ⁻ | 60 |
| 1.2 <i>Ex vivo</i> | 61 |
| 1.2.1 Determinación de O ₂ ⁻ en células Integrina-β5 ⁺ | 61 |
| 1.2.1 Determinación de O ₂ ⁻ en células GFP ⁺ | 62 |
| 2. Las diferencias en la producción de ROS entre neuronas y astrocitos no son debidas a las NOX o XO, siendo el complejo I mitocondrial un plausible candidato | 64 |
| 2.1 Papel de las NOX y XO en la producción de ROS | 64 |
| 2.1.1 Contribución de la XO | 64 |
| 2.1.2 Contribución de las NOX | 64 |
| 2.1.2.1 Efecto del inhibidor VAS2870 | 65 |
| 2.1.2.2 Silenciamiento p22 ^{phox} | 65 |
| 2.2 Efecto de los inhibidores de la cadena transportadora sobre las ROS | 66 |
| 3. La actividad de los complejos de la cadena transportadora mitocondrial no es responsable de las diferencias en la producción de ROS entre neuronas y astrocitos | 69 |
| 4. La generación de O ₂ ⁻ por el transporte reverso de electrones no es responsable de las diferencias en la producción de ROS | 73 |
| 5. Los astrocitos presentan elevados niveles de complejo I desactivado, reduciendo el consumo de O ₂ a través del complejo | 74 |
| 6. Diferencias en el ensamblaje del complejo I explican la diferente producción de ROS entre neuronas y astrocitos | 76 |
| 7. El silenciamiento de NDUFS1 en neuronas modula el ensamblaje del complejo I e incrementa la producción de ROS | 82 |
| 8. La sobreexpresión de NDUFS1 en astrocitos modula el ensamblaje del complejo I y reduce la producción de ROS | 84 |
| 9. El tratamiento con antioxidantes modula el ensamblaje de la cadena transportadora de electrones y su producción de ROS | 86 |
| 10. La producción de ROS en los astrocitos ejerce un papel señalizador | |
| 5. Discusión | 93 |
| 6. Conclusiones | 99 |

| | |
|--|------------|
| 7. Resumen en Inglés | 103 |
| Abstract | 105 |
| 1. Introduction | 105 |
| 1.1 ROS: fleeting signalling molecules | 106 |
| 1.1.1 ROS production sites | 106 |
| 1.1.2 ROS signalling | 107 |
| 1.1.3 ROS and neurological diseases | 107 |
| 1.2 Complex I | 108 |
| 1.2.1 Complex I: structure and assembly | 108 |
| 1.2.2 ROS generation by complex I | 109 |
| 1.3 Supercomplexes | 109 |
| 1.3.1 Factors involved in supercomplexes stability | 109 |
| 1.3.2 Supercomplexes assembly | 110 |
| 1.3.3 Supercomplexes and ROS production | 110 |
| 1.4 Cellular composition of brain | 110 |
| 2. Hypothesis and Objectives | 111 |
| 3. Materials and Methods | 112 |
| 4. Results | 116 |
| 4.1 Astrocytes produce high levels of ROS, and its origin is mitochondrial | 116 |
| 4.2 NOX and XO activities are not responsible of ROS differences between neurons and astrocytes, being complex I a plausible candidate | 119 |
| 4.3 Mitochondrial complexes activities are not responsible of the differences in ROS production | 121 |
| 4.4 Complex I in astrocytes occurs highly deactivated, reducing O ₂ consumption | 123 |
| 4.5 Assembly and composition of complex I is different in neurons and astrocytes | 124 |
| 4.6 Modulation of complex I composition affects complex I assembly and ROS production | 129 |
| 4.7 Reduction of ROS levels affects complex I assembly | 131 |
| 4.8 ROS produced by astrocytes have a signalling role | 132 |
| 5. Discussion | 134 |
| 6. Conclusions | 136 |
| 8. Bibliografía | 139 |
| Abreviaturas | 153 |

1. INTRODUCCIÓN



Durante décadas se ha propagado la idea de que la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es la consecuencia indeseada, o colateral, del metabolismo celular. Así, las ROS han sido ampliamente consideradas como el subproducto de ciertas reacciones metabólicas a las cuales hay que aniquilar. Probablemente todos hemos contribuido, de una forma u otra, a propagar esta idea. En efecto, los estudios iniciales –y algunos aun recientes- encaminados a dilucidar las funciones de las ROS han abusado de la utilización ectópica de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a concentraciones que superan varios órdenes de magnitud a las fisiológicas (que no alcanzan el rango micromolar ¹). Como era de esperar, la conclusión-consenso es la “demonización” de las ROS –por su elevada toxicidad a tales concentraciones- y la búsqueda de terapias antioxidantes para intentar paliar enfermedades asociadas al exceso de ROS. Por desgracia, ningún ensayo clínico realizado hasta el momento ha demostrado eficacia con terapias antioxidantes, al menos en enfermedades neurológicas –las más proclives a asociarse con el exceso de ROS o estrés oxidativo ². Independientemente de que este fracaso requiera un profundo análisis, al menos aprenderemos de ello que las ROS no son, quizás, tan deletéreas como se consideraba, al menos cuando se producen en concentraciones fisiológicas. No obstante, a juzgar por resultados obtenidos en animales de experimentación, en determinados procesos patogénicos –isquemia/reperfusión e inflamación- se genera un gran exceso de ROS que sí parece estar asociado con daño celular. En cualquier caso, debemos asimilar que la formación de ROS no tiene por qué ser un proceso secundario e indeseado del metabolismo celular. Las ROS se forman específicamente en reacciones químicas catalizadas (enzimáticamente y, en pocos casos, por metales) a través de mecanismos cada vez mejor conocidos. En esta Tesis Doctoral aportamos datos que –creemos- demuestran que la formación de ROS está finamente regulada en el sistema nervioso central, lo que interpretamos como una excelente prueba de que estas moléculas juegan importantes funciones fisiológicas en biología.

1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS): EFÍMERAS MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS

Se entiende por ROS una o más moléculas derivadas de la captación de un electrón por el oxígeno, quedando el electrón en un orbital desapareado. Así, la captación de un electrón por el O_2 produce $O_2^{\cdot-}$ (anión superóxido); la captación de dos electrones más (y dos protones, H^+) por el $O_2^{\cdot-}$ produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2); el peróxido puede captar aun un electrón más, lo que genera radical hidroxilo ($\cdot OH$) e ión hidroxilo (OH^-). Finalmente, la captura de un electrón (y H^+) por $\cdot OH$ genera agua (H_2O) (**Figura 1**) ³. Genéricamente, son ROS anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.

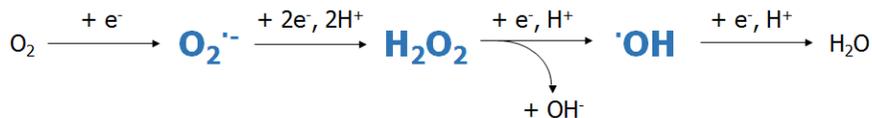


Figura 1. Captación de electrones y protones en el proceso de generación de ROS

La generación de ROS a partir de oxígeno se produce gracias a la captación sucesiva de electrones y protones.

Se conocen distintas formas de generación de ROS en biología, y es difícil establecer cuál es más importante. Esta dificultad se debe a la ausencia de métodos cuantitativos reproducibles, en términos absolutos, en sistemas biológicos vivos ⁴. Asimismo, las formas de generar ROS varían entre tejidos y células, lo que dificulta aún más determinar qué fuente de ROS es la más importante. Sabiendo que la generación de $\text{O}_2^{\cdot -}$ es el primer paso en la formación de ROS, conocer en profundidad cómo se produce esta molécula resulta esencial para entender la importancia fisiológica de las ROS. En la siguiente sección se recogen los mecanismos moleculares mejor conocidos de formación de $\text{O}_2^{\cdot -}$, entre los cuales destacamos algunos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, las NADPH (nicotidamida adenina dinucleótido fosfato) oxidasas (NOXs), la xantina oxidasa y algunas reacciones del metabolismo de la dopamina.

El H_2O_2 es una especie reactiva y, por tanto, químicamente inestable. Puede generarse en algunas reacciones del metabolismo de la dopamina, directa o indirectamente, sin embargo, la forma mejor conocida es la catalizada por las superóxido dismutasas (SODs), de las que se conocen tres isoformas que varían en su localización: citosólica (Cu/Zn-SOD o SOD1), mitocondrial (MnSOD o SOD2) y extracelular (EC-SOD o SOD3) ⁵.

Así, una vez formado el H_2O_2 por cualquiera de los mecanismos arriba descritos, se descompone dada su inestabilidad. En presencia de altas concentraciones de metales de transición reducidos (Fe^{2+} , Cu^+), genera $\cdot\text{OH}$ y OH^- por las reacciones de Fenton o de Haber-Weiss (en la que interviene $\text{O}_2^{\cdot -}$) ⁶ (**Figura 2**). Dada su naturaleza altamente reactiva y pro-oxidante, se piensa que el $\cdot\text{OH}$ es el responsable de los efectos deletéreos. No obstante, estas reacciones (Fenton o Haber-Weiss) compiten con otros eficientes mecanismos enzimáticos que anulan el H_2O_2 mediante su reducción a H_2O . Estas enzimas son la catalasa, localizada en el citosol y peroxisomas, las peroxirredoxinas (Prxs) y las glutatión peroxidasas (GPxs) ⁷.

Las Prxs son peroxidasas basadas en cisteínas que no requieren cofactores para su actividad. Durante el ciclo catalítico las Prxs son oxidadas por H_2O_2 generando ácido sulfénico o un puente disulfuro intermolecular. La regeneración de las Prx (retorno al estado reducido) es llevada a cabo por las Trx, y sulfirredoxinas ⁸. Existen seis subfamilias de Prx en mamíferos, siendo la Prx1 las más expresada en la célula (0.1-1% de las proteínas solubles celulares). Esta subfamilia se localiza en el citosol, núcleo, mitocondria y retículo endoplasmático ⁹.

Las Trx son proteínas pequeñas (alrededor de 12 kDa) que presentan dos cisteínas en su centro activo redox. Controlan la función de proteínas diana gracias a su

función oxidoreductasa, acoplado su actividad con las Prx en el proceso de eliminación del H_2O_2 ⁸. Estas enzimas donan un átomo de hidrógeno a los enzimas involucrados en la reducción, tales como las Prx, manteniendo a las cisteínas de las proteínas reducidas¹⁰. Existen dos isoformas de Trx en humanos, Trx1 en el citosol, y Trx2 localizada en la mitocondria. Las Trxs participan en la reducción de ácidos sulfénicos y puentes disulfuro, regenerándose gracias a las tiorredoxinas reductasas (TrxR)¹¹. En cambio, cuando las Prxs se encuentran sobreoxidadas, habiéndose formado ácido sulfínico, intervienen las sulfirredoxinas, reduciendo a las Prxs mediante el consumo ATP^{11,12}.

A su vez, las GPxs catalizan la reducción de H_2O_2 , o hidroperóxidos orgánicos, a H_2O o a sus correspondientes alcoholes. Existen ocho familias de GPxs (GPx1-8) en humanos, con diferente localización y expresión subcelular. La familia GPx1 se expresa tanto en citosol como en mitocondria¹. Las selenio-GPxs (GPx1, 3 y 4), GPx2, 5 y 6 usan glutatión (GSH) como agente reductor, generando GSSG (glutatión oxidado)¹. Las cisteína-GPx (GPx7-8) son reducidas por las Trx, comportándose mecánicamente como las Prxs¹.

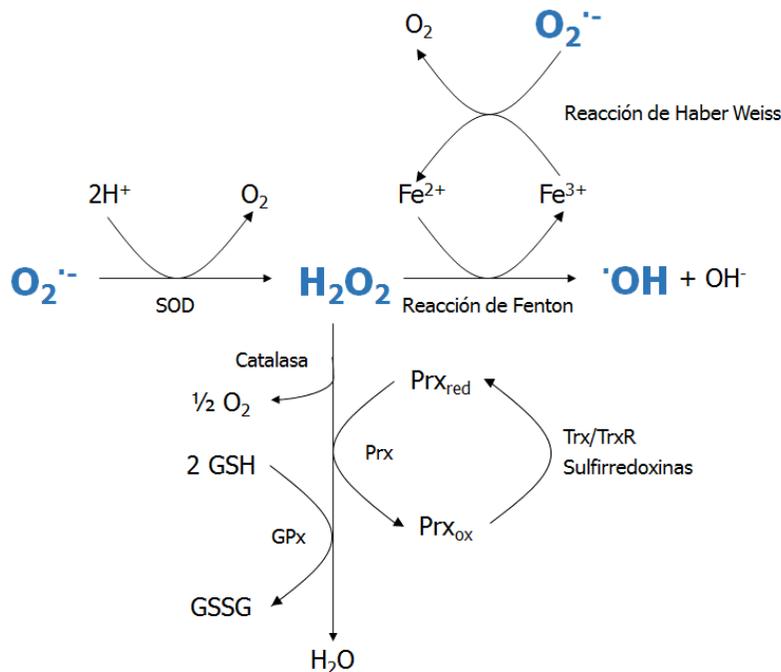


Figura 2. Generación y detoxificación de las especies reactivas de oxígeno

Durante el proceso de reducción de $O_2^{\cdot-}$ por acción de la SOD se genera H_2O_2 . La conversión de H_2O_2 en H_2O sucede en presencia de catalasas, GPxs (gracias a la oxidación de GSH), y Prxs, junto a sus enzimas reductores Trxs/TrxsR y sulfirredoxinas. Así mismo, el H_2O_2 genera $\cdot OH$ mediante las reacciones de Fenton y Haber Weiss.

A pH fisiológico, las membranas biológicas son impermeables al $O_2^{\cdot-}$, si bien se cree que algunas proteínas tales como VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*),

presente en la membrana externa mitocondrial, lo puede transportar ¹³. El H₂O₂ difunde a través de las membranas por difusión pasiva, aunque se ha descrito que las acuaporinas (AQP), presentes en la membrana interna mitocondrial (AQP8-9), pueden transportarlo ^{14,15}.

1.1 Sitios de producción de ROS

Dada la corta vida media de las ROS (un nanosegundo en el caso del ·OH, y un microsegundo para el O₂⁻), sus posibles dianas moleculares deben estar situadas en las cercanías del lugar donde se originan. Por lo tanto, conocer los sitios específicos donde se producen es importante para esclarecer los efectos biológicos de las ROS. En la mitocondria se localizan varios de los sistemas productores de O₂⁻, si bien en el citoplasma y en la membrana plasmática existen igualmente. A continuación, describiremos los más importantes.

1.1.1 NADPH oxidasas

Las NOXs catalizan la oxidación de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) o NADPH a NAD⁺ o NADP⁺, utilizando O₂ y generando ROS. Existen siete miembros, NOX1-5 y Duox1-2 (oxidasa dual 1-2), que se diferencian entre sí por sus diferentes perfiles de producción de ROS. NOX1, 2, 3 y 5 están ancladas a la membrana plasmática y liberan O₂⁻ hacia el espacio extracelular, participando en procesos como inmunidad innata (NOX2) y control de la presión arterial (NOX1) ¹⁶. NOX4 produce principalmente H₂O₂ y se localiza en la membrana mitocondrial externa y en el retículo endoplasmático ¹⁶.

1.1.2 Xantina oxidasa

La xantina oxidasa (XO) genera O₂⁻ (28%) y H₂O₂ (72%) en el proceso de conversión de hipoxantina en xantina, y de xantina en ácido úrico. Su producción se ha asociado a procesos de isquemia/reperfusión, por lo que su contribución es baja en condiciones fisiológicas ^{17,18}.

1.1.3 Dopamina

La dopamina, neurotransmisor de la familia de las catecolaminas, produce ROS durante su catabolismo, lo que repercute en la homeostasis redox neuronal. Así, la monoamino oxidasa, localizada en la membrana mitocondrial externa, produce H₂O₂ durante el proceso de desaminación oxidativa de la dopamina. Por otro lado, la dopamina, así como las demás catecolaminas, se oxidan por acción de las ciclooxigenasas o tirosinasas, entre otras enzimas, lo que genera O₂⁻, puesto que el O₂ es el aceptor de electrones. Muchos productos derivados del metabolismo de la dopamina, como son las quinonas, semiquinonas y el salsolinol (una tetrahidroisoquinolina derivada de la condensación de la dopamina con acetaldehído), son moléculas oxidantes, por lo que pueden reaccionar con determinados componentes celulares alterando su función y, si se acumulan en exceso, causando potencialmente neurodegeneración ^{19,20}.

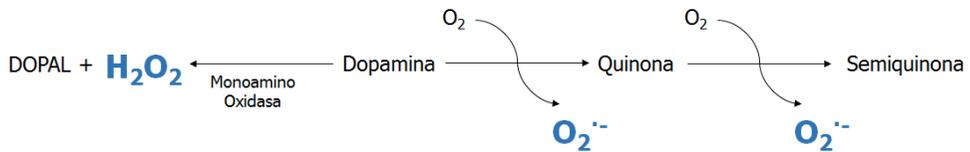


Figura 3. Generación de especies reactivas de oxígeno a partir de dopamina

Durante el proceso de desaminación oxidativa, catalizado por la monoamino oxidasa, la dopamina genera H₂O₂ y DOPAL (3,4-dihidroxifenilacetaldehído). La oxidación de la dopamina, ya sea por catálisis química (Fe³⁺) o enzimática (ciclooxigenasas, tirosinasas u otros enzimas) genera O₂⁻ e intermediarios oxidantes, como las quinonas y semiquinonas ²⁰.

1.1.4 α-Ketoglutarato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa

La α-ketoglutarato deshidrogenasa es un complejo enzimático del ciclo de Krebs, localizado en la matriz mitocondrial. Participa en la conversión de α-ketoglutarato en succinil-CoA. Genera O₂⁻ en condiciones de alta razón NADH/NAD⁺ y durante procesos de isquemia/reperfusión, donde se produce una acidificación del pH y un incremento en Zn²⁺, asociado a una disminución en la actividad catalítica del enzima. Dentro del complejo enzimático, la actividad ROSgénica se localiza en la subunidad E3, habiéndose descrito mutaciones relacionadas con un incremento en la producción de ROS ^{21,22}. La subunidad E3 de este complejo enzimático se encuentra también en la piruvato deshidrogenasa, por lo que ésta puede generar O₂⁻ en condiciones similares, aunque en menor medida que la α-ketoglutarato deshidrogenasa ⁴.

1.1.5 Cadena respiratoria mitocondrial

La mayor parte de la energía que se requiere para los procesos endergónicos se genera en la mitocondria durante el proceso de fosforilación oxidativa. El proceso consiste en conservar la energía redox de los sustratos metabólicos en forma de ATP (adenosín trifosfato). Para ello, la cadena transportadora de electrones se encarga primero de transferir electrones desde estos sustratos hasta el oxígeno, mediante un proceso que conserva la energía redox en forma de un gradiente de protones a ambos lados de la membrana interna mitocondrial (potencial de membrana o ΔΨ_m). Y, segundo, este gradiente de H⁺ se utiliza por la ATP sintasa para generar ATP a partir de ADP (adenosín difosfato) y fosfato inorgánico. Los complejos I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa), III (ubiquinol:citocromo *c* reductasa) y IV (citocromo *c* oxidasa) son los que contribuyen en la generación del transporte de protones. Otras enzimas pueden transferir electrones hacia la ubiquinona, si bien la energía de este proceso específico no se conserva dado que carecen de la capacidad de bombear protones hacia el espacio intermembrana. Se trata del complejo II (succinato:ubiquinona oxidoreductasa), la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPDH) y la flavoproteína transportadora de electrones (ETF) ²³. Algunos componentes responsables de la fosforilación oxidativa, que se enumeran a continuación, producen O₂⁻.

1.1.5.1 Complejo I

El complejo I es el complejo enzimático más grande de la cadena transportadora, cuya estructura y función se detallará en profundidad más adelante (2. *Complejo I*). Presenta una forma en "L" con un brazo embebido en la membrana lipídica y el otro que sobresale hacia la matriz mitocondrial. Une NADH en la zona distal de la región hidrofílica y transfiere dos electrones, en pasos sucesivos, a través de FMN (flavín mononucleótido) y siete dominios Fe-S a la ubiquinona, unida en la interfase entre los dos brazos del complejo. La energía de oxidorreducción de la ubiquinona se utiliza para inducir un cambio conformacional en el complejo que permite el bombeo de cuatro H⁺ hacia el espacio intermembrana ²⁴.

Así, el complejo I produce O₂⁻ cuando la razón NADH/NAD⁺ es alta (originada en condiciones de daño, mutación, isquemia, pérdida de citocromo *c*, o alta concentración de NADH como consecuencia de una baja demanda energética) y en presencia de inhibidores que interacciona en el sitio de unión de la ubiquinona en el complejo, como por ejemplo la rotenona ⁴.

Este complejo además produce O₂⁻ de forma "reversa". Esta situación se produce cuando la ubiquinona se encuentra reducida (ubiquinol), y el $\Delta\Psi_m$ es alto, lo que fuerza el transporte de electrones en sentido retrógrado (es decir, desde el ubiquinol hacia el complejo I), contribuyendo en la reducción de NAD⁺ en NADH, generando O₂⁻. Por tanto, el transporte reverso de electrones (y la consiguiente formación de O₂⁻) se puede suprimir con rotenona. Si bien experimentalmente con el transporte reverso se puede conseguir una enorme producción de O₂⁻ a partir de succinato (por tanto, con participación de succinato:ubiquinona oxidoreductasa o complejo II), su relevancia en condiciones fisiológicas parece ser muy baja ⁴.

1.1.5.2 Complejo II

El complejo II, también conocido como succinato deshidrogenasa (SDH), se encarga de la oxidación de succinato en fumarato, generando FADH₂ (flavín adenín dinucleótido). Transfiere los electrones a través de tres dominios Fe-S a ubiquinona, transformándola en ubiquinol. La enzima está compuesta por cuatro subunidades, SDHA, SDHB, SDHC y SDHD. El complejo II representa el punto de encuentro entre el ciclo de Krebs y la cadena electrónica mitocondrial, siendo el único complejo que no participa en la generación del $\Delta\Psi_m$. La producción de O₂⁻ por la SDH se asocia a mutaciones que conducen a la pérdida de electrones. Además, en condiciones de baja concentración de succinato, el sitio catalítico queda más accesible al O₂ pudiendo producirse la pérdida de electrones y la producción de O₂⁻. Su actividad influye en la producción de O₂⁻ por los complejos I y III. Los inhibidores del complejo II presentan efectos ambivalentes sobre la producción de ROS, dependiendo de la concentración de sustrato, $\Delta\Psi_m$ y las actividades de los complejos enzimáticos de la cadena transportadora de electrones y el ciclo de Krebs ^{25,26}. Por ejemplo, los inhibidores que bloquean el sitio de unión de ubiquinona en el complejo II, como la thenoiltrifluoroacetona, incrementan la producción de O₂⁻ en condiciones de baja concentración de succinato ²⁷.

1.1.5.3 mGPDH

La mGPDH se encuentra localizada en la parte exterior de la membrana mitocondrial interna. Forma parte de la lanzadera de glicerolfosfato, cuya función, dividida en una parte mitocondrial y otra citosólica, permite la regeneración de dihidroxiacetona fosfato en la mitocondria, oxidando NADH en el espacio intermembrana y formando FADH₂ en la matriz, cuyos electrones se ceden a la ubiquinona. La mGPDH produce O₂⁻ durante la oxidación de α-glicerolfosfato, en condiciones de alta concentración de sustrato y bajo ΔΨ_m. La producción se ve favorecida durante la isquemia/reperfusión, situación asociada a una disminución en la transferencia electrónica. El Ca²⁺ aumenta su afinidad por el sustrato, lo que contribuye a su actividad ROSgénica, si bien depende del ΔΨ_m²². El sitio de producción de ROS se localiza en la zona de unión de la ubiquinona²⁶.

1.1.5.4 ETF

La ETF se encarga de introducir en la cadena transportadora mitocondrial los electrones provenientes de la β-oxidación de los ácidos grasos y del catabolismo de los aminoácidos. Este enzima produce O₂⁻ y H₂O₂ en condiciones que inducen un cambio de conformación en su estructura, o generan interacciones defectivas proteína-proteína con las acetil coenzima A deshidrogenasas que le ceden los electrones²⁸.

1.1.5.5 Complejo III

El complejo III presenta una estructura dimérica. Es el responsable de la oxidación de ubiquinol en ubiquinona a través de un intermediario inestable, semiquinona, en el sitio catalítico Q_o. Realiza dos transferencias de un electrón, bombeando cuatro H⁺ al espacio intermembrana. El aceptor final de los electrones es el citocromo c²⁹. El complejo III de mamíferos está compuesto por 11 subunidades, 3 grupos hemo, y un centro Fe-S.

La producción de O₂⁻ por el complejo III ocurre cuando su sitio Q_i (centro de reducción) se encuentra inhibido con antimicina A y en presencia de ubiquinol, formándose el O₂⁻ por la interacción del O₂ con la semiquinona que se encuentra en el Q_o (centro de oxidación). El sitio de producción de O₂⁻ es el sitio Q_o. La antimicina A participa en la estabilización de sitio Q_o, y por consiguiente, en la producción de O₂⁻. Los factores que afectan a la estabilidad de la semiquinona en el sitio Q_o son capaces de modular la producción de O₂⁻, como la pérdida de citocromo c, cambios en el ΔΨ_m, o en los estados redox de ubiquinona y de citocromo c. De hecho, la producción se incrementa exponencialmente con el ΔΨ_m. Gracias a que la producción se establece en los sitios Q_o, el O₂⁻ se libera tanto al espacio intermembrana como hacia la matriz (**Figura 4**). La producción observada por el complejo III no resulta comparable con los altos niveles de producción del complejo I^{4,30}.

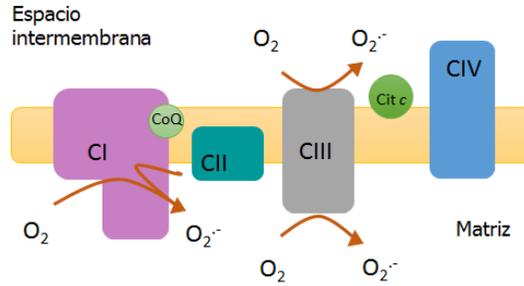


Figura 4. Producción de ROS por la cadena transportadora de electrones

En la figura se muestran los diversos complejos mitocondriales junto a los elementos móviles (CI: complejo I, CII: complejo II, CIII: complejo III, CIV: complejo IV, CoQ: ubiquinona, Cit c: citocromo c). El CI produce O₂⁻ hacia el espacio intermembrana de manera directa y reversa. El CIII libera O₂⁻ hacia el espacio intermembrana y la matriz.

1.2 Señalización a través de ROS

El H₂O₂ podría actuar como un segundo mensajero en el proceso de señalización redox, puesto que presenta mayor estabilidad que el O₂⁻. Difunde a través de las membranas, y gracias al transporte mediado por las AQP, está sujeto a un mayor grado de regulación. La oxidación reversible de cisteínas y metioninas constituye el principal mecanismo de señalización redox ³¹. La modificación ejercida por el H₂O₂ sobre las cisteínas genera hidroxilación, formándose ácido sulfénico, sulfínico y/o sulfónico. Los procesos de oxidación también puede conducir a la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares. Por otro lado, la oxidación mediada por glutatión oxidado (GSSG) conduce a la glutatiónilación de proteínas ^{32,33}.

La señalización por ROS principalmente se encarga de la propia defensa celular frente al estrés oxidativo, reestableciendo la homeostasis redox. No obstante, presenta otras funciones fisiológicas, como la regulación de la vasculatura, control de la tensión de oxígeno, y la transducción de señales desde varios receptores celulares ⁶.

Un buen ejemplo de señalización mediada por ROS es la activación del factor transcripcional NRF2 (*nuclear erythroid-related factor 2*), encargado de inducir la transcripción de genes antioxidantes, tales como *HO-1* (hemo-oxigenasa 1), *NQO-1* (NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1) o *GCLC* (glutamato cisteína ligasa catalítica). En condiciones basales, NRF2 se encuentra secuestrado en el citosol gracias a su unión a KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) y Cul3 (culina-3). KEAP1 actúa como sensor de estrés oxidativo y adaptador de sustratos, permitiendo la interacción de NRF2 con Cul3, que participa en la poliubiquitinación de NRF2 para su posterior degradación por el proteasoma. El estrés oxidativo incrementa los niveles de NRF2, y provoca la oxidación de cisteínas en KEAP1 (cisteína 273 y 288), induciendo un cambio conformacional en el complejo KEAP1-Cul3 que evita la ubiquitinación de NRF2, impidiendo su degradación ³⁴.

El cambio conformacional en el complejo va acompañado de la modificación postraduccional de KEAP1 (oxidación cisteína 151) y NRF2 (fosforilación serina 40) ³⁵ que culminan con la disociación de NRF2 del complejo KEAP1-Cul3 y su translocación al núcleo, incrementando la transcripción de genes antioxidantes.

El funcionamiento de las Prxs, encargadas de la reducción del H₂O₂ a H₂O, se encuentra altamente regulado por el nivel de oxidación ocasionado por el H₂O₂ ³³. Tal y como se comentó con anterioridad, la producción de ROS a nivel celular se encuentra delimitada espacialmente. Es por ello por lo que la inactivación de las Prxs, mediada por el H₂O₂, permite la acumulación local del H₂O₂ y su actividad señalizadora, presentando estas enzimas un papel esencial en los procesos de señalización redox ⁹.

También se ha descrito cómo las ROS pueden participar en el control del ciclo celular. De hecho, la salida de ciclo de los cardiomiocitos posterior al nacimiento es regulada por los niveles de ROS. El incremento en la concentración de O₂ promueve la producción de ROS, causando daño en el DNA (ácido desoxiribonucleico) y la consiguiente parada de ciclo, como consecuencia de la activación del punto de control de daños en el DNA. Este proceso está originado por el cambio del metabolismo, de glucólisis a fosforilación oxidativa, que conduce al incremento en la producción de ROS mitocondrial ³⁶.

Las ROS, derivadas de la actividad de las NOX y de la mitocondria, tienen un papel importante en inmunidad ³⁷. Poseen actividad bactericida y participan en el mantenimiento de la respuesta inmune al sostener la activación de las células T, prolongando la inflamación hasta que la amenaza ha sido eliminada ³⁸. Además, participan en la respuesta inflamatoria, al contribuir a la activación del inflamasoma ³⁹.

La producción de O₂⁻ por el complejo III se asocia a la estabilización de HIF1 α (factor inducible por hipoxia 1- α). Las ROS participan en la inhibición de las proliil hidroxilasas (PHD), encargadas de degradación de HIF1 α , mediada por hidroxilación, en condiciones de normoxia ⁴⁰. La generación de O₂⁻, que ocurre a baja concentración de O₂, permitiría el crecimiento, la reprogramación metabólica y la supervivencia celular, al permitir la actividad transcripcional de HIF1 α ⁴¹.

Estos son sólo algunos ejemplos que evidencian funciones fisiológicas para las ROS. No obstante, queda mucho por conocer acerca del funcionamiento de las ROS, lo que aportará luz al tratamiento de numerosos procesos patológicos, al mismo tiempo que permitirá discernir las consecuencias de la administración de antioxidantes sobre el funcionamiento celular ³⁸.

1.3 ROS y enfermedades neurodegenerativas

Con la edad se acumulan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos oxidados en el cerebro, incrementándose en condiciones patológicas, como las enfermedades neurodegenerativas.

1.3.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) está marcada por la pérdida progresiva de la memoria y la discapacidad cognitiva, asociada a insuficiencias en la señalización colinérgica y acumulación intracelular y extracelular de β -amiloide. Se han encontrado deficiencias en la actividad de la α -ketoglutarato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, y de manera más común, en el complejo IV. En pacientes en diferentes estadios de la enfermedad se ha observado una disminución en los sistemas antioxidantes SOD, catalasa, GPx y glutatión reductasa^{2,42}. La disfunción mitocondrial se piensa que está causada por la translocación incompleta y acumulación del péptido precursor del β -amiloide en la membrana mitocondrial. Este péptido, una vez procesado promueve la liberación de citocromo *c* (gracias a la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial) e inhibe al complejo I, incrementando la producción de ROS. Además, el β -amiloide afecta a los procesos de fusión y fisión mitocondrial⁴³ y produce excitotoxicidad, gracias a la liberación de glutamato desde la glía. La liberación de glutamato produce óxido nítrico, que interacciona con el $O_2^{\cdot-}$ formando peroxinitrito, incrementando el daño oxidativo y nitrosativo⁴⁴. No obstante, el daño oxidativo se ha detectado aún en ausencia de β -amiloide, es decir, en fases tempranas de la enfermedad. A pesar de las claras evidencias del estrés oxidativo en la AD, no se sabe si es causa o consecuencia de la enfermedad.

1.3.2 Enfermedad de Parkinson

En la enfermedad de Parkinson (PD) se han encontrado niveles elevados de ROS. Los síntomas de esta enfermedad están causados por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*. También se observa la acumulación de agregados proteicos, cuerpos de Lewi, en las regiones cerebrales afectadas. Ciertas sustancias, como el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), rotenona o Paraquat, provocan la enfermedad (PD esporádico) al inhibir al complejo I e incrementar la producción de ROS⁴⁴. En los casos de PD familiar se han descrito mutaciones en proteínas involucradas con la función mitocondrial. Se trata de PINK1 (PTEN inducible quinasa 1), DJ-1 o Parkina, que afectan al metabolismo glucídico, complejo I y producción de ROS^{45,46}. El complejo I se plantea como el eje ROSgénico en PD⁴⁷, habiéndose descrito deficiencias y mutaciones en diversas subunidades (NADH deshidrogenasa (ubiquinona) flavoproteína 2 –NDUFV2-; NADH deshidrogenasa (ubiquinona) proteína Fe-S 3 –NDUFS3-) en los pacientes^{48,49}. Por otra parte, la activación de la microglía, mediante la neuromelanina liberada por las neuronas muertas, o por la exposición a las sustancias tóxicas que causan PD, conduce a la generación de óxido nítrico. El óxido nítrico difunde hacia las neuronas dopaminérgicas, donde interacciona con $O_2^{\cdot-}$ generando peroxinitrito, un potente agente oxidante que nitrifica a las proteínas e inhibe a la tirosina hidroxilasa, disminuyendo la síntesis de dopamina. Defectos en la actividad de los enzimas antioxidantes y el GSH, también se han encontrado en pacientes con la enfermedad²⁰.

1.3.3 Esclerosis lateral amiotrófica

En la esclerosis lateral amiotrófica se observa una pérdida progresiva de motoneuronas y de las uniones neuromusculares. Puede desarrollarse de manera

esporádica o familiar, con mutaciones en SOD1². En las autopsias realizadas a pacientes se ha descrito un incremento en los indicadores de estrés oxidativo (peroxidación lipídica y glicoxidación de proteínas)⁵⁰. El estrés oxidativo afecta a la liberación de transmisores sinápticos. Se produce un desajuste en los niveles de Ca²⁺ y disfunción mitocondrial. Las NOX presentes en las células de Schwann (equivalentes a los oligodendrocitos en sistema nervioso periférico) y en la musculatura, podrían contribuir a los altos niveles de ROS. La inflamación en la enfermedad representa una fuente adicional de ROS, debido a la activación de la microglía y a la infiltración de células T, células dendríticas y macrófagos⁵¹.

1.3.4 Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington está causada por mutaciones de repetición en el gen de la *huntingtina*. Como consecuencia de la mutación se producen proteínas que forman agregados, causando la pérdida de las neuronas de la espina dorsal media y del núcleo caudado, afectando a otras regiones cerebrales conforme avanza la enfermedad. Esta enfermedad se caracteriza por la discapacidad motora, cambios de personalidad y una disminución de la capacidad cognitiva. En la enfermedad se produce disfunción mitocondrial, que conduce a la generación de ROS. La enfermedad cursa con baja actividad de los complejos II y III, bajo $\Delta\Psi_m$, disminución del número y tamaño de las mitocondrias, baja respiración y producción de ATP, alta fragmentación mitocondrial y fallos en la mitofagia, generándose un ciclo vicioso catastrófico para la supervivencia neuronal. Además, se han descrito elevados niveles de NOX, constituyendo una fuente adicional de ROS en la enfermedad. Las ROS producidas se piensa que contribuyen a la expansión de las repeticiones en el gen de la *huntingtina* durante la replicación del DNA^{2,52}.

1.3.5 Isquemia/reperfusión

En los procesos de isquemia/reperfusión se produce un primer evento de estrés oxidativo causado por la propia bioquímica del proceso (incremento de la concentración de O₂ posterior a la hipoxia), seguido de eventos secundarios como la excitotoxicidad o la neuroinflamación. El proceso se caracteriza por la acumulación de succinato durante la isquemia, generado gracias a la reducción de fumarato por el trabajo reverso de la SDH. Durante la reperfusión, el succinato acumulado es oxidado rápidamente, generando una sobrerreducción de ubiquinona, forzando a los electrones a viajar en reverso hacia el complejo I generando O₂⁻, que contribuye al daño y muerte celular⁵³.

1.3.6 Terapias con antioxidantes

A pesar de que en todas estas patologías se observa un incremento en la producción de ROS, el tratamiento con antioxidantes no ha demostrado efectos beneficiosos en humanos².

En los casos de administración a largo plazo de vitamina E se ha observado un incremento en el riesgo de infartos hemorrágicos. Esto puede ser debido al desconocimiento sobre las dianas exactas de los antioxidantes testados y/o a la

farmacodinámica o farmacocinética en humanos. La mayor parte de los estudios con antioxidantes se han realizado en modelos animales, que representan una pequeña fracción del perfil genético de la enfermedad, y están sometidos a un menor número de factores ambientales, dificultando la extrapolación de resultados a humanos. Por otra parte, la incapacidad de medir las ROS *in vivo* hace que se trabaje en situaciones moderadamente inciertas.

La administración exógena de antioxidantes podría estar modificando las defensas antioxidantes endógenas, obstaculizando los propios mecanismos protectores. Además, los tratamientos antioxidantes en las enfermedades neurodegenerativas deben atravesar la barrera hematoencefálica, lo que dificulta la llegada de las terapias a las zonas afectadas. No debemos olvidar el diagnóstico tardío que se produce en la mayoría de las patologías, demorando el acceso de los pacientes a los ensayos clínicos a situaciones en las que la enfermedad se encuentra muy avanzada, reduciendo las posibilidades de mejora ^{2,51,54}. Por otra parte, si las ROS juegan un papel en la adaptación del tejido al daño, su reducción podría tener consecuencias deletéreas ³⁸.

2. COMPLEJO I

El complejo I es el punto de entrada de electrones desde el NADH a la cadena transportadora mitocondrial. Se trata de un polipéptido compuesto por 44 subunidades en mamíferos, de masa cercana a 1 MDa. Como aceptor de los electrones presenta al cofactor FMN. Los electrones son transferidos desde el FMN, a través de siete centros Fe-S, a la ubiquinona. Otro centro Fe-S próximo al FMN (N1a), no parece estar involucrado en la transferencia electrónica, si no en la prevención de la generación excesiva de ROS ^{4,24}, al actuar como un almacén temporal de electrón, minimizando la vida media de la flavosemiquinona ⁵⁵. El transporte de dos electrones en el complejo I está asociado al bombeo de cuatro H⁺ desde la matriz al espacio intermembrana.

De las 44 subunidades del complejo I (**Tabla 1**), 7 subunidades están codificadas por el DNA mitocondrial, y 37 por el núcleo. Catorce de sus 44 subunidades son esenciales: NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1-2, MTND1-6 y MTND4L ⁵⁶, mientras que el resto de subunidades participan en la biogénesis del complejo, estabilidad estructural o protección frente al estrés oxidativo ^{57,58}.

Tabla 1. Subunidades del complejo I

| Símbolo | Nombre | Codificación | Esencial |
|----------------|---|---------------------|-----------------|
| MTND1 | NADH deshidrogenasa codificada en la mitocondria 1 | Mitocondrial | Sí |
| MTND2 | NADH deshidrogenasa codificada en la mitocondria 2 | Mitocondrial | Sí |
| MTND3 | NADH deshidrogenasa codificada en la mitocondria 3 | Mitocondrial | Sí |
| MTND4 | NADH deshidrogenasa codificada en la mitocondria 4 | Mitocondrial | Sí |
| MTND4L | NADH deshidrogenasa codificada en la mitocondria 4L | Mitocondrial | Sí |
| MTND5 | NADH deshidrogenasa codificada en la mitocondria 5 | Mitocondrial | Sí |
| MTND6 | NADH deshidrogenasa codificada en la mitocondria 6 | Mitocondrial | Sí |
| NDUFA1 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α 1 | Nuclear | |
| NDUFA2 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α 2 | Nuclear | |
| NDUFA3 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α 3 | Nuclear | |
| NDUFA5 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α 5 | Nuclear | |
| NDUFA6 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α 6 | Nuclear | |
| NDUFA7 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α 7 | Nuclear | |
| NDUFA8 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α 8 | Nuclear | |
| NDUFA9 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α 9 | Nuclear | |
| NDUFA10 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α 10 | Nuclear | |
| NDUFA11 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α 11 | Nuclear | |
| NDUFA12 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α 12 | Nuclear | |
| NDUFA13 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α 13 | Nuclear | |
| NDUFAB1 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α/β 1 | Nuclear | |
| NDUFB1 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo β 1 | Nuclear | |
| NDUFB2 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo β 2 | Nuclear | |
| NDUFB3 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo β 3 | Nuclear | |
| NDUFB4 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo β 4 | Nuclear | |
| NDUFB5 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo β 5 | Nuclear | |
| NDUFB6 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo β 6 | Nuclear | |
| NDUFB7 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo β 7 | Nuclear | |
| NDUFB8 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo β 8 | Nuclear | |
| NDUFB9 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo β 9 | Nuclear | |
| NDUFB10 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo β 10 | Nuclear | |
| NDUFB11 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo β 11 | Nuclear | |
| NDUFC1 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo desconocido 1 | Nuclear | |
| NDUFC2 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo desconocido 2 | Nuclear | |
| NDUFS1 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) proteína Fe-S 1 | Nuclear | Sí |
| NDUFS2 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) proteína Fe-S 2 | Nuclear | Sí |
| NDUFS3 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) proteína Fe-S 3 | Nuclear | Sí |
| NDUFS4 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) proteína Fe-S 4 | Nuclear | |
| NDUFS5 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) proteína Fe-S 5 | Nuclear | |
| NDUFS6 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) proteína Fe-S 6 | Nuclear | |
| NDUFS7 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) proteína Fe-S 7 | Nuclear | Sí |
| NDUFS8 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) proteína Fe-S 8 | Nuclear | Sí |
| NDUFV1 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) flavoproteína 1 | Nuclear | Sí |
| NDUFV2 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) flavoproteína 2 | Nuclear | Sí |
| NDUFV3 | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) flavoproteína 3 | Nuclear | |

El complejo I se localiza en la membrana mitocondrial interna. Presenta una estructura en forma de "L", con un brazo hidrofílico, y una región hidrofóbica perpendicular a él (**Figura 5**). En la región hidrofílica se sitúan los módulos de entrada (módulo N) y salida de electrones (módulo Q), en los que se encuentran presentes todos los cofactores redox (FMN y dominios Fe-S). El módulo N (en el que se sitúa NDUFV1, NDUFV2 y NDUFS1) es el encargado de la oxidación de NADH gracias al grupo FMN, primer aceptor de los electrones. En el módulo Q se localiza el sitio de reducción de la ubiquinona. En la región transmembrana se ubica el módulo P, en el que se encuentran las proteínas codificadas por el DNA mitocondrial. Se trata de la región presumiblemente involucrada en el bombeo de protones ^{57,59}.

El grupo FMN se localiza en la proteína NDUFV1, mientras que la zona de unión de la ubiquinona se sitúa entre las proteínas NDUFS2, NDUFS7, MTND1 y MTND3 ²³. Los

dominios Fe-S se ubican en las proteínas: N1a en NDUFV2; N1b, N4 y N5 en NDUFS1; N2 en NDUFS7; N3 en NDUFV1 y N6a y N6b en NDUFS8. La ruta seguida por los electrones desde el FMN a la ubiquinona es la siguiente: FMN-N3-N1b-N4-N5-N6a-N6b-N2-ubiquinona ⁶⁰ (**Figura 5**). El dominio N5, debido a su potencial eléctrico, y a la separación que presenta con N6a, posiblemente corresponda con el punto de control de la transferencia electrónica ²³.

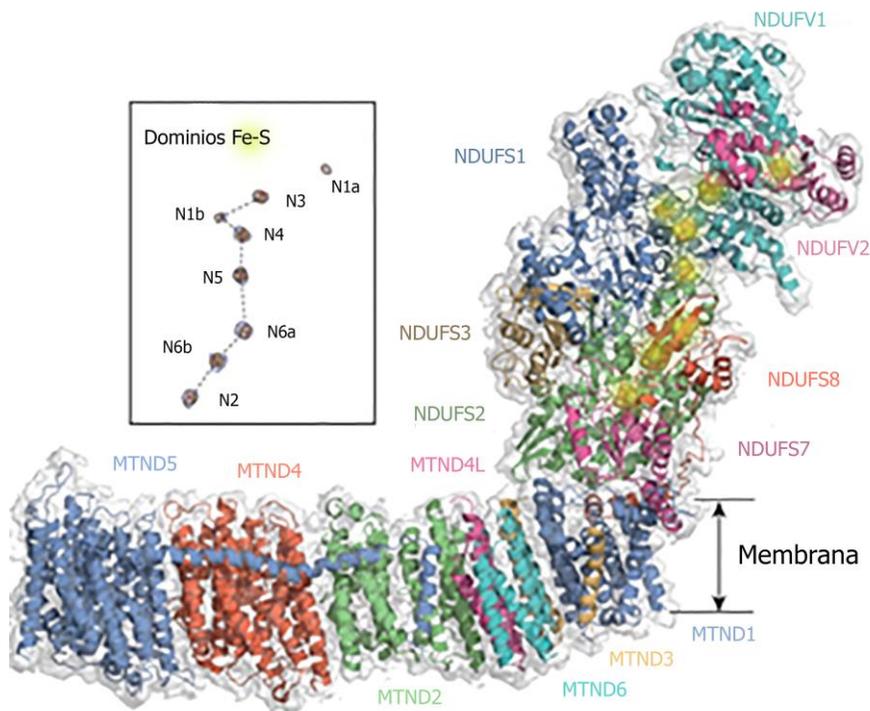


Figura 5. Estructura de las subunidades esenciales del complejo I

En la imagen se muestra la estructura de las subunidades esenciales del complejo I. Las subunidades están coloreadas individualmente, junto a su nomenclatura en *Mus musculus*. En el diagrama adjunto se muestra la secuencia de transferencia de electrones a través de los dominios Fe-S. La estructura corresponde con el complejo I de *Bos taurus*. Modificada de Vinotumar *et al.* ⁵⁸.

Se desconoce cómo se produce el acoplamiento entre el transporte de protones y la transferencia de electrones en el complejo I ²³.

La actividad del complejo I puede regularse postraduccionalmente, mediante fosforilación, acetilación, glutationilación, maduración proteolítica y degradación de subunidades. Por ejemplo, el transporte a la mitocondria de NDUFS4 (subunidad necesaria para el ensamblaje del complejo I) ocurre de manera dependiente de la fosforilación mediada por cAMP (adenosín monofosfato cíclico), regulando el ensamblaje del complejo ⁶¹. La fosforilación de la subunidad NDUFV2 resulta necesaria para la actividad NADH deshidrogenasa del complejo ⁶².

2.1 Estructura y ensamblaje

La estructura completa del complejo I de mamíferos se desconoce, debido a la complejidad que presenta su estudio mediante cristalografía. No obstante, la disposición de las subunidades ha sido parcialmente clarificada mediante microscopía electrónica, habiéndose situado las 14 subunidades esenciales y 13 subunidades accesorias. Sin embargo, 17 subunidades todavía no se encuentran localizadas ⁵⁸.

El ensamblaje del complejo I se ha estudiado en organismos simples (*Yarrowia lipolytica*, *Neurospora crassa*) donde la mayoría de las subunidades de mamíferos no se encuentran presentes ^{57,63,64}. Mediante estos estudios se ha podido demostrar la secuencialidad del proceso, a través de la generación de subcomplejos de diversos tamaños. Este ensamblaje secuencial ha sido confirmado posteriormente en mamíferos mediante el trabajo con mutaciones en subunidades o con el etiquetado de las proteínas con GFP (proteína verde fluorescente), entre otras estrategias ^{56,59,65}. Las subunidades del módulo N son la últimas en incorporarse al enzima, permitiendo su recambio de manera rápida para minimizar los efectos del estrés oxidativo.

Varias de las subunidades no esenciales para la actividad de complejo I se han asociado a su ensamblaje y/o estabilidad, puesto que sus mutaciones conducen a la acumulación de subcomplejos o reducción en los niveles del complejo I completamente ensamblado. Se trata de las subunidades NDUFS4, NDUFS6, NDUFA2, NDUFA10 y NDUFA11 ⁶⁶, cuya deficiencia se ha asociado a diversas patologías, como el síndrome de Leigh.

Se han descrito, por el momento, varios factores de ensamblaje: ECSIT (*evolutionarily conserved signalling intermediate in Toll pathway*), NDUFAF1-6 (NADH deshidrogenasa (ubiquinona) factor de ensamblaje 1-6) ⁶⁷, IND1 (proteína Fe-S requerida para la NADH deshidrogenasa 1), ACAD9 (acil-coenzima A deshidrogenasa 9) ⁶⁸, C3ORF1, FOXRED1 (*FAD-dependent oxidoreductase domain containing 1*) y TMEM126B (proteína transmembrana 126B) ⁶⁹. La ausencia de estas proteínas origina defectos en el ensamblaje, generando subcomplejos. IND1 participa en el ensamblaje de los dominios Fe-S en el complejo I. En ausencia de IND1 se producen deficiencias mitocondriales asociadas a la carencia del complejo I, como disminución de supercomplejos, incremento en la producción de lactato y pérdida de crestas mitocondriales ⁷⁰.

El complejo I puede sufrir dos procesos de biogénesis, de nuevo, o mediante un reemplazamiento selectivo de subunidades, impidiendo la acumulación de subunidades dañadas que podrían afectar a la fosforilación oxidativa ⁷¹.

Podemos encontrar al complejo I en dos estados estructurales y catalíticos diferentes, el estado A o activo, y el estado D o durmiente (desactivado). La transición entre las formas A/D ocurre en condiciones de baja concentración de sustratos, O₂, o bajos niveles de respiración. También puede ocurrir cuando el recambio del complejo I es bajo ⁷². Esta modificación de la actividad viene acompañada de un cambio de conformación en el sitio de unión de ubiquinona, impidiendo la transferencia de electrones. Se piensa que estos estados diferentes del complejo I permitirían a la célula

adaptarse a cambios en las necesidades metabólicas, puesto que en condiciones fisiológicas encontramos en torno al 5-15% del complejo I en su forma inactiva (D). Por otra parte, durante los procesos de isquemia/reperfusión, la presencia del complejo I en la forma D prevendría daños oxidativos durante la reperfusión ⁷³.

La forma D del complejo I actúa como un antiporter Na^+/H^+ , permitiendo el bombeo de protones en situaciones de carencia de sustratos, manteniendo el potencial de membrana. En el estado D no existe conexión funcional entre los módulos redox y la actividad antiporter. Las subunidades responsables del transporte Na^+/H^+ son MTND2, MTND4 y MTND5 ⁷².

2.2 Generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por el complejo I

El complejo I produce principalmente $\text{O}_2^{\cdot-}$ ^{55,74}. Sin embargo, el lugar exacto de producción no se encuentra localizado. Se postula la existencia de dos posibles sitios, el FMN y el dominio Fe-S N2.

La generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por el FMN se produciría cuando la flavina se encuentra completamente reducida, cediendo un electrón al O_2 que se encuentra en el centro activo ⁴. La producción por el FMN depende de la razón NADH/NAD^+ , deteniéndose con excesos de NAD^+ (la determinación establecida en estas circunstancias excluyó experimentalmente el efecto del potencial de membrana). Este proceso de producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por el complejo I explica la producción asociada a la presencia de inhibidores que bloquean el sitio de unión de ubiquinona (como por ejemplo rotenona) y la que sucede durante el transporte reverso, debido a que ambos procesos modifican la razón NADH/NAD^+ de manera favorable a la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ ⁷⁴.

El dominio N2 está considerado como el donador de los electrones a ubiquinona, consistiendo el proceso en dos pasos consecutivos en los que se transfieren dos electrones hasta conseguir su completa reducción a ubiquinol. Se trata del dominio Fe-S con mayor potencial eléctrico, compatible con la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$, y mayor accesibilidad al O_2 . Este dominio se localiza en una región accesible a H^+ , H_2O y a las proteínas que unen ubiquinona. La producción a través de N2 explicaría como los inhibidores que bloquean el sitio de unión de la quinona (rotenona, piercidina A, rolliniastatina-1, -2) son capaces de incrementar las ROS ⁷⁵ de forma similar a como lo hacen los análogos de la ubiquinona de cadena corta ⁷⁶.

En condiciones fisiológicas, se piensa que la mayor contribución a la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ la ejercería el dominio N2, puesto que el FMN no quedaría accesible al formar parte de los supercomplejos. La contribución del FMN se incrementaría en condiciones de destabilización de los supercomplejos o en situaciones *in vitro* ⁷⁷.

El punto exacto de producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ durante el transporte reverso se desconoce ⁴. Sin embargo, el complejo I, mediante la S-nitrosilación de su subunidad MTND3 en la cisteína 39, evita la producción excesiva del $\text{O}_2^{\cdot-}$ durante el transporte reverso al inactivar de manera transitoria al complejo ⁷⁸.

La ruptura de proteínas esenciales para la función del complejo I, tales como NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3 y NDUFV1, como consecuencia de la acción de granzimas, se asocia a un incremento de la producción de $O_2^{\cdot -}$ por parte del complejo I ⁷⁹.

3. SUPERCOMPLEJOS

La organización de los complejos mitocondriales puede ser explicada de acuerdo a diferentes modelos (**Figura 6**). El modelo fluido postula la difusión de los complejos en la membrana mitocondrial, estableciéndose la transferencia electrónica cuando se produce la colisión entre ellos. En el modelo sólido, por el contrario, los complejos se encontrarían formando parte de estructuras rígidas de orden superior, los supercomplejos, para llevar a cabo un transporte rápido y eficiente de los electrones. Y, por último, en el modelo plástico, los complejos cambiarían desde su forma libre a supercomplejos para adaptarse al metabolismo celular ⁸⁰.

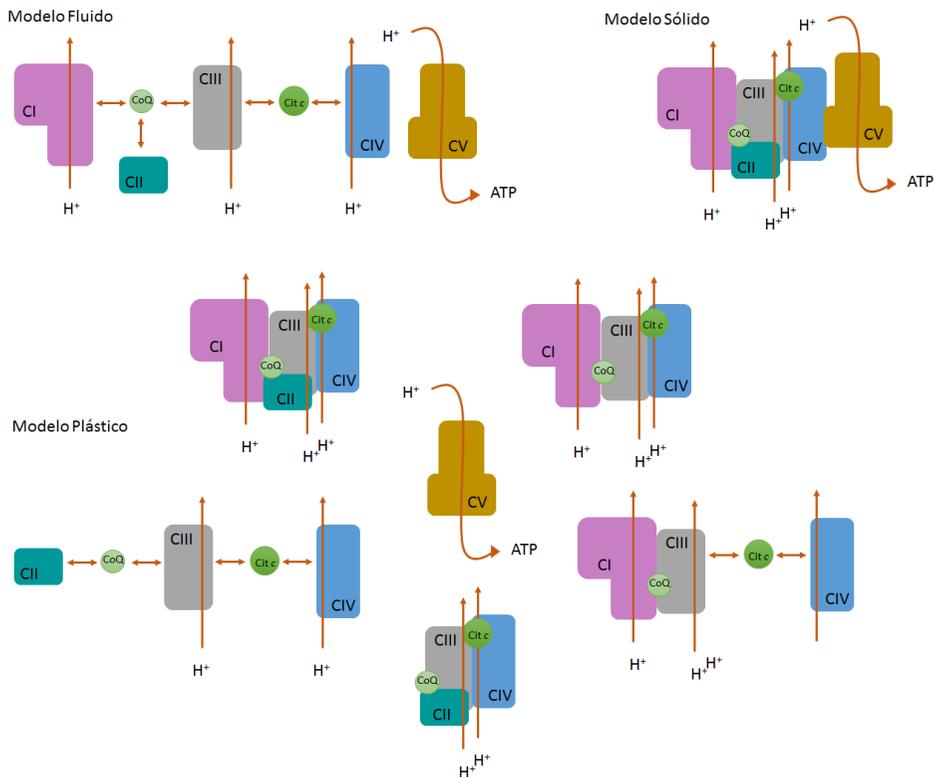


Figura 6. Organización de la cadena transportadora mitocondrial de acuerdo a los diferentes modelos

En la figura se muestran los diferentes modelos de organización mitocondrial ⁸⁰. En el modelo fluido los complejos (CV: complejo V) difunden en la membrana interna. De acuerdo al modelo sólido los complejos se organizan en estructuras superiores, supercomplejos. El modelo plástico propone la

adaptación de la mitocondria a diferentes situaciones mediante la organización variante de los complejos en supercomplejos. Solo se muestra una unidad por complejo, aunque la estequiometría puede variar.

Los supercomplejos representan estados superiores de ensamblaje entre los complejos I, III y IV. La participación del complejo II se encuentra sometida a debate dado que principalmente se observa libre. No obstante, se ha detectado su presencia en la región de los supercomplejos⁸⁰, posiblemente como consecuencia de la formación de estructuras de alto peso molecular consigo mismo⁸¹, puesto que que no se ha demostrado interacción directa con los complejos I, III y IV.

El complejo V forma dímeros, responsables de la curvatura de la membrana mitocondrial interna. La formación de crestas mitocondriales permite incrementar la superficie mitocondrial, y localizar un mayor número de complejos enzimáticos en la mitocondria⁸².

A pesar de la controversia existente acerca de la existencia de los supercomplejos, desde un punto de vista fisiológico se ha demostrado como respiran⁸⁰, integran los elementos móviles (citocromo *c* y ubiquinona)^{80,83,84}, y minimizan la generación de $O_2^{\cdot-}$ a través del complejo I⁷⁷.

Los supercomplejos ofrecerían a la célula ventajas estructurales y funcionales: (i) incrementando la estabilidad de los complejos^{65,85}; (ii) optimizando la transferencia electrónica y la canalización de sustratos, al minimizar las distancias de difusión de la ubiquinona y el citocromo *c*^{86,87}; (iii) promoviendo la oxidación eficiente de sustratos vía NADH o $FADH_2$ ⁸³; y (iv) minimizando la generación de $O_2^{\cdot-}$ ⁷⁷.

La determinación de la estructura del supercomplejo I-III₂-IV ha permitido conocer la distancia entre los puntos de unión del citocromo *c* en los complejos III y IV (10-11 nm). Esta corta distancia permitiría la rápida difusión del citocromo *c* durante la transferencia electrónica, aportando datos estructurales a favor de la canalización de sustratos gracias a la formación de supercomplejos⁸⁸.

La existencia de supercomplejos separa las distintas poblaciones de ubiquinona, de forma que podemos encontrar ubiquinona destinada a la transferencia de electrones desde NADH, en los supercomplejos que contienen al complejo I. Por otra parte, se encontraría la población de ubiquinona libre, que aceptaría los electrones del complejo II y de otras enzimas que usan FAD como cofactor (como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa)⁸³.

No obstante, la existencia de depósitos de ubiquinona capaces de aceptar electrones de diferentes sustratos se encuentra a debate. Blaza *et al.*⁸⁹ proponen la existencia de una única población de ubiquinona capaz de aceptar los electrones de NADH o succinato. De igual forma, rechazan la canalización de sustratos mediada por los supercomplejos, contradiciendo el trabajo de Bianchi *et al.*⁸⁶.

3.1 Factores involucrados en la estabilización de los supercomplejos

Varios factores se han asociado a la estabilidad de los supercomplejos: el contenido lipídico, la composición y forma de la membrana mitocondrial interna, el potencial de membrana mitocondrial ⁹⁰, y las modificaciones postranscripcionales que ocurren sobre los complejos individuales. No obstante, el mecanismo de alguno de ellos todavía es desconocido ¹³.

3.1.1 Contenido lipídico

Cuanto mayor sea la razón fosfolípidos/proteínas en la membrana interna menor ensamblaje en supercomplejos se observa ⁸⁷. La cardiolipina participa en la estabilización de los supercomplejos y de los complejos individuales, siendo un elemento estructural en los complejos III, IV y supercomplejos ⁸⁸. Mutaciones en los genes de síntesis de la cardiolipina (*taz*), asociados al síndrome de Barth, conducen a la disminución de los supercomplejos y menor estabilidad del complejo I ⁹¹. Además, la pérdida de cardiolipina se ha asociado a la inactividad del complejo III. Se piensa que la cardiolipina participaría en la neutralización de la carga de las lisinas, favoreciendo la estabilización de los supercomplejos ⁹². La peroxidación lipídica podría afectar, por tanto, a la agregación proteica y a la formación de los supercomplejos ⁸⁷.

3.1.2 Potencial de membrana

El potencial de membrana podría contribuir a la desestabilización de los supercomplejos al incrementar la formación de ROS cuando se encuentra elevado ⁹⁰. La estimulación de la producción de ROS conduce a una desestabilización de los supercomplejos y del complejo I ⁹³. No obstante el mecanismo de acción del $\Delta\Psi_m$ se desconoce. Se piensa que los supercomplejos podrían responder a variaciones en el $\Delta\Psi_m$ como consecuencia de la modificación de las interacciones electrostáticas/hidrofóbicas que permiten la formación de los supercomplejos, aunque no ha sido demostrado ⁸⁷.

3.1.3 Modificaciones postraduccionales

Las modificaciones postraduccionales afectan a los complejos individuales, tanto en su estabilidad como en su actividad, pudiendo afectar al ensamblaje de los supercomplejos. Por ejemplo, durante el fallo cardiaco se produce una disminución en la fosforilación oxidativa asociado a una reducción en los niveles de supercomplejos, incrementándose la fosforilación del complejo IV. Esta fosforilación del complejo IV podría reducir su ensamblaje, o inducir su liberación de los supercomplejos ⁹⁴.

3.1.4 Forma de la membrana interna

La forma de la membrana interna afecta a la formación de los supercomplejos. Cogliati *et al.* ⁹⁵ demostraron, mediante la inducción de la apoptosis y la modificación genética de OPA-1 (*optic atrophy 1*), una proteína reguladora de la forma de la membrana interna, como el remodelado de las crestas mitocondriales disminuye la abundancia de los supercomplejos, reduciendo la respiración mediada por el complejo I.

3.2 Mecanismos de ensamblaje

El ensamblaje de los supercomplejos es aún una incógnita. De acuerdo con Moreno-Lastres *et al.* ⁸⁵, los supercomplejos se forman de manera secuencial, y no a partir de complejos preensamblados. El proceso partiría de un subcomplejo del complejo I (~830 kDa), carente del módulo N, al que se unen los complejos III y IV, y el módulo N en etapas finales. Este modelo explicaría cómo deficiencias en el complejo III o IV afectan a la actividad del complejo I, al verse reducida su estabilidad como resultado de su desensamblaje de los supercomplejos.

De hecho, mutaciones en el complejo III causan deficiencias en el complejo I al reducir su estabilidad ^{93,96}. Este proceso no ocurre a la inversa, es decir, deficiencias en el complejo I no afectan a la estabilidad o función del complejo III ^{96,97}. Sin embargo, Ugalde *et al.* ⁶⁵ han observado una menor estabilidad del complejo III en pacientes con mutaciones en las subunidades NDUFS2 y NDUFS4, sin afectar a su actividad.

De acuerdo con Acín-Pérez *et al.* ⁸⁰, el ensamblaje de los supercomplejos ocurriría a partir de los complejos libres completamente ensamblados. Esta hipótesis queda sustentada en experimentos que demuestran cómo es posible encontrar al complejo I completamente ensamblado en situaciones de deficiencia en el complejo III o IV ^{98,99}, incompatible con el modelo de Moreno-Lastres *et al.* ⁸⁵.

No obstante, la estabilidad del complejo I se ve incrementada al formar parte de los supercomplejos, puesto que mutaciones que afectan al ensamblaje, fosforilación y/o actividad del complejo (en la subunidad NDUFS4, responsable de la unión del módulo N) no conducen a la pérdida de actividad del complejo I que forma supercomplejos con el complejo III ¹⁰⁰. De igual forma sucede con el complejo III, ya que se han descrito mutaciones que afectan a su ensamblaje y no conducen a defectos en el ensamblaje del complejo III que forma parte de los supercomplejos ⁹⁹. Estos experimentos evidencian una mayor estabilidad de los complejos individuales al formar parte de los supercomplejos, estableciéndose entre ellos relaciones estructurales que favorecen, de manera cooperativa, su ensamblaje, o bien, una retención de los complejos individuales completamente ensamblados en los supercomplejos.

3.2.1 Factores de ensamblaje

Diversos trabajos han descrito factores involucrados en el ensamblaje de los supercomplejos en células de mamíferos. Algunos de ellos participan en el ensamblaje de manera indirecta, al influir sobre el ensamblaje de los complejos individuales.

COX7RP (proteína relacionada con la citocromo *c* oxidasa, subunidad VIIa) afecta a la abundancia del respirasoma (I-III₂-IV_n). En condiciones de deficiencia de esta proteína, la capacidad mitocondrial se ve afectada, observándose una disminución en la actividad del complejo IV, producción de ATP, y disminución de los supercomplejos I-III₂-IV_n ¹⁰¹.

DNAJC15 (DnaJ (Hsp40) homólogo, subfamilia C, miembro 15) es una cochaperona mitocondrial que regula de manera negativa la actividad del complejo I, previniendo la hiperpolarización mitocondrial y restringiendo la síntesis de ATP. Además, afecta a la abundancia de los supercomplejos al bloquear su formación ¹⁰².

TMEM126B es un factor de ensamblaje del complejo I cuya carencia se ha asociado a una disminución en la cantidad de los supercomplejos, posiblemente como consecuencia de una reducción en la estabilidad del complejo I ¹⁰³.

C11ORF83 (UQC3: factor de ensamblaje del complejo ubiquinol-citocromo *c* reductasa 3) es un factor de ensamblaje del complejo III que participa en la estabilización del supercomplejo III₂-IV. Además, interacciona con la cardiolipina, por lo que su carencia se asocia a la desorganización de la membrana mitocondrial interna, estando ambos procesos posiblemente conectados dada la relación existente entre la forma de las crestas mitocondriales y la formación de supercomplejos ¹⁰⁴.

SCAFI (factor de ensamblaje de supercomplejos I) es un factor que participa en la interacción del complejo III con el IV, por lo que se encuentra presente en los supercomplejos III-IV y no en los complejos individuales. Existen dos isoformas de esta proteína con diferente funcionalidad. La isoforma funcional está presente en ratas Wistar, y ratones CBA-J, 129, NZB y CD-1, mientras que los ratones C57Bl6 y Balb/cJ presentan la isoforma no funcional. La presencia de este factor delimita diferentes poblaciones de complejo IV, permitiendo la oxidación de múltiples sustratos ⁸³.

3.3 Supercomplejos y ROS

El complejo I presenta mayor estabilidad al formar parte de los supercomplejos, disminuyendo su contribución a la generación de ROS. El sitio FMN reduce su accesibilidad al O₂ debido a la proximidad del complejo III. Además, cuando el complejo I se encuentra desensamblado de los supercomplejos, la subunidad NDUFV1, que contiene al FMN, puede encontrarse más suelta, permitiendo su interacción con el O₂ ⁹⁰. Por otra parte, el ensamblaje del complejo I en supercomplejos reduciría la generación de O₂⁻ a partir de sustratos NAD al mantener a la cadena en su estado oxidado ¹³.

Maranzana *et al.* ⁷⁷, mediante aproximaciones *in vitro* con el empleo de liposomas, han demostrado una disminución en la producción de O₂⁻ por el complejo I cuando forma supercomplejos con el complejo III.

La desestabilización de los supercomplejos, como consecuencia del estrés oxidativo, puede generar un proceso de retroalimentación al incrementar la producción de ROS. En este contexto, la producción de ROS se favorecería como consecuencia de (i) la disminución en la eficiencia de la transferencia electrónica y/o translocación de protones; (ii) el incremento en la oxidación lipídica, especialmente sobre la cardiolipina; y (iii) por daño oxidativo sobre el complejo I ¹³.

Es por ello por lo que las modificaciones fisiológicas que regulen la abundancia de los supercomplejos podrían contribuir a la regulación de las ROS, reforzando su papel

señalizador ¹³. De hecho, durante el envejecimiento se produce una disminución en la abundancia de los supercomplejos, sin afectar a la cantidad de los complejos individuales, contribuyendo a la pérdida de la función mitocondrial ¹⁰⁵. De igual forma, se ha observado como la abundancia de las subunidades hidrofílicas del complejo I varía con la edad, disminuyendo la capacidad oxidativa del complejo e incrementando la producción de O_2^- ¹⁰⁶. Estas evidencias dan soporte a la teoría mitocondrial del envejecimiento, en la que se propone a las ROS como agentes inductores de mutaciones sobre el DNA mitocondrial que conducen a la pérdida de función de la mitocondria ¹³. No obstante, esta teoría se encuentra a debate dada la incapacidad de numerosas aproximaciones antioxidantes de incrementar la esperanza de vida (por ejemplo, mediante la sobreexpresión SOD1), o de disminuirla, a través de la supresión de los sistemas antioxidantes (reducción SOD2), en diversos modelos animales ^{10,107}.

4. COMPOSICIÓN CELULAR DEL CEREBRO

El cerebro es un órgano complejo con una alta demanda energética, puesto que a pesar de constituir el 2% del peso del organismo, es responsable del consumo del 20% de la glucosa y el oxígeno ¹⁰⁸.

Durante los últimos años ha habido una tendencia a estudiar el cerebro desde un punto de vista neurocéntrico, a través de proyectos como el *Human Connectome Project* [www.humanconnectomeproject.org], y el BRAIN (*Brain Research through Advancing Innovative Neurotechnologies*) [<http://braininitiative.nih.gov/>]. Mediante estas iniciativas, se pretende conocer las conexiones neuronales, con la finalidad de discernir el funcionamiento cerebral en condiciones fisiopatológicas. Sin embargo, esta aproximación deja de lado a las células de la glía, que hacen posible que las conexiones tengan lugar, por lo que aportará una visión muy reducida acerca del funcionamiento del cerebro ¹⁰⁹.

4.1 Neuronas

Las neuronas son las células excitables del cerebro, encargadas de la transmisión nerviosa. Su estructura celular se encuentra organizada en dos partes diferenciadas, el cuerpo o soma (en el que se localizan las dendritas) y el axon. Ostentan propiedades excitadoras o inhibitoras de los potenciales sinápticos ¹¹⁰. Las neuronas se clasifican en relación a sus propiedades anatómicas, moleculares o electrofisiológicas ¹¹¹.

El funcionamiento y metabolismo neuronal presenta una clara interdependencia de las células de la glía, de hecho, se estima que el cerebro humano presenta únicamente un 15% de neuronas ¹¹².

4.2 Astrocitos

Los astrocitos constituyen la población celular más abundante en cerebro. Filogenéticamente se incrementa su número respecto al de las neuronas al aumentar la complejidad del sistema nervioso central ¹¹³.

A diferencia de lo que se ha considerado históricamente, los astrocitos representan una población heterogénea, que expresa diferentes marcadores dependiendo de la región cerebral en la que se encuentra, con funciones especializadas en relación al circuito neuronal al que da soporte ¹¹⁴. Los astrocitos participan en la reparación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica mediante la secreción de factores solubles (como citoquinas, factores de crecimiento o sustancias lipídicas) ¹¹⁵. Controlan el flujo sanguíneo mediante la liberación de metabolitos del ácido araquidónico, óxido nítrico, glutamato y/o ATP, en respuesta a Ca^{2+} ¹¹⁶. Junto a la microglía, los astrocitos participan en el sistema inmune intrínseco del sistema nervioso central ¹¹².

Gracias a sus prolongaciones, los astrocitos realizan funciones de soporte estructural, al conectar vasos sanguíneos y sinápsis ¹¹⁷, controlando el volumen del espacio intersticial ¹¹⁸. La presencia de bombas y transportadores en los astrocitos les permite regular la homeostasis del hierro, ROS y neurotransmisores en el espacio intersticial ^{113,119}. Además, los astrocitos captan K^+ del medio extracelular, manteniendo una concentración adecuada para el funcionamiento neuronal. Asimismo, participan en la regulación del pH ¹¹³.

En la transmisión sináptica se ha acuñado el término de sinapsis tripartita, formando parte de ella la neurona pre- y postsináptica, y el astrocito ¹²⁰. Los astrocitos responden a los neurotransmisores, tales como el glutamato, generando ondas de Ca^{2+} que liberan gliotransmisores (glutamato, D-serina, ATP, adenosina, GABA (ácido γ -aminobutírico), TNF α (factor de necrosis tumoral α), prostaglandinas, péptidos y proteínas). Los gliotransmisores modulan la excitabilidad neuronal y la plasticidad sináptica de manera selectiva a la red neuronal que ha generado la señal, el tipo de receptor activado, la neurona pre- o post sináptica, y la temporalidad de la señal ^{118,120,121}. Los astrocitos se encuentran acoplados gracias a las uniones en hendidura (*gap junctions*), estableciendo una red de comunicación que permite la expansión de señales localizadas a grandes zonas cerebrales, incrementando la complejidad de la transmisión sináptica ¹²⁰.

4.3 Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos, u oligodendroglía, emiten prolongaciones que envuelven los segmentos internodales de los axones (vainas de mielina) para facilitar la rápida transmisión de los impulsos nerviosos. También realizan labores de apoyo metabólico y trófico a los axones ¹¹⁷. Un oligodendrocito puede mielinizar varios axones, por lo que su posible disfunción podría afectar varias conexiones neuronales ¹²². Los oligodendrocitos participan en el aprendizaje, habiéndose descrito cambios en la mielinización asociados a la adquisición de nuevas habilidades ¹²³. Fallos en la mielinización generan graves patologías, siendo la esclerosis múltiple la más común ¹²⁴.

4.4 Microglia

La microglía constituye la defensa homeostática del cerebro. Participa en la inmunidad en el sistema nervioso central, por lo que se consideran los macrófagos residentes del cerebro. Existen diferentes tipos de microglía en función del momento del

desarrollo, o de su estado de activación. La microglía ameboide se localiza en el cerebro fetal, participando en la eliminación de células durante el desarrollo del cerebro, y facilitando la formación y supervivencia de los circuitos neuronales, gracias a la secreción de factores tróficos. La microglía ramificada se encuentra en condiciones de reposo en el cerebro adulto. En respuesta a diferentes estímulos, como una infección microbiana, la microglía ramificada se convierte en microglía reactiva o activada, con morfología ameboide, produciendo diferentes moléculas que ayudan a la defensa del cerebro. La microglía puede modular la excitabilidad y plasticidad neuronal en algunas redes neuronales ¹¹⁷. Además, posee la habilidad de eliminar células muertas mediante fagocitosis, y estructuras sinápticas durante la maduración sináptica. Asimismo, la microglía participa en la transmisión sináptica mediante la secreción de factores tróficos y señales sinaptogénicas ^{112,125}.

4.5 Acoplamiento metabólico entre neuronas y astrocitos

4.5.1 Lanzadera de lactato

Las neuronas y los astrocitos presentan un metabolismo compartido de acuerdo a la hipótesis de la lanzadera de lactato. Esta hipótesis postula la captación de glucosa en el sistema nervioso central por los astrocitos. Mediante glucólisis anaerobia los astrocitos convierten glucosa en lactato, que es enviado a las neuronas para servir como sustento metabólico ¹²⁶. Este proceso está desencadenado por el glutamato liberado por las neuronas, puesto que los astrocitos introducen glutamato de manera Na^+ -dependiente, estimulando la captación de glucosa y la glucólisis, e incrementando la liberación de lactato ¹²⁷.

4.5.2 Ciclo glutamato-glutamina

El glutamato captado por los astrocitos es transformado en glutamina, que es liberada al espacio sináptico para su absorción por parte de las neuronas. Las neuronas convierten la glutamina en glutamato para utilizarlo como neurotransmisor. Este ciclo es conocido como la lanzadera glutamato-glutamina. Esto es posible gracias a la presencia, en los astrocitos, y no en las neuronas, de la enzima glutamina sintetasa, que transforma glutamato en glutamina. Las neuronas captan glutamina y la convierten en glutamato mediante la glutaminasa, permitiéndoles recuperar sus reservas de glutamato. Este proceso permite la eliminación del glutamato, potencialmente tóxico, del espacio sináptico, liberando glutamina que es sinápticamente inactiva. Los astrocitos regeneran glutamato mediante una vía complementaria, fijando un grupo amino en el α -ketoglutarato. Este proceso disminuye las reservas de α -ketoglutarato disponibles para el ciclo de Krebs, que los astrocitos solventan mediante la expresión exclusiva de la piruvato carboxilasa. Gracias a la piruvato carboxilasa, los astrocitos fijan CO_2 sobre piruvato generando oxalacetato, un intermediario del ciclo de Krebs ¹²⁸.

4.5.3 Antioxidantes

Los astrocitos expresan y acumulan numerosos antioxidantes, lo que los hace menos susceptibles al estrés oxidativo que las neuronas ¹²⁹. El principal sistema

antioxidante en cerebro es el glutatión, un cofactor necesario para la detoxificación de peróxidos, que se acumula en mayor medida en astrocitos. La capacidad de síntesis de GSH en astrocitos es mucho mayor que en neuronas ¹³⁰. Además, los astrocitos envían a las neuronas los precursores necesarios para la síntesis de glutatión (glutamina, cisteína y glicina) ¹³¹. Los astrocitos acopian catalasa, vitamina E, y presentan elevados niveles de expresión de NRF2 ¹³¹. La activación de la vía NRF2 por parte de los astrocitos estimula la síntesis de glutatión para proteger de manera eficiente a las neuronas del daño oxidativo ¹³². Las neuronas son capaces de regular su defensa antioxidante a través de la vía de las pentosas fosfato, gracias a la cual generan NADPH, que es utilizado para mantener al glutatión en su estado reducido ejerciendo neuroprotección ¹³³.

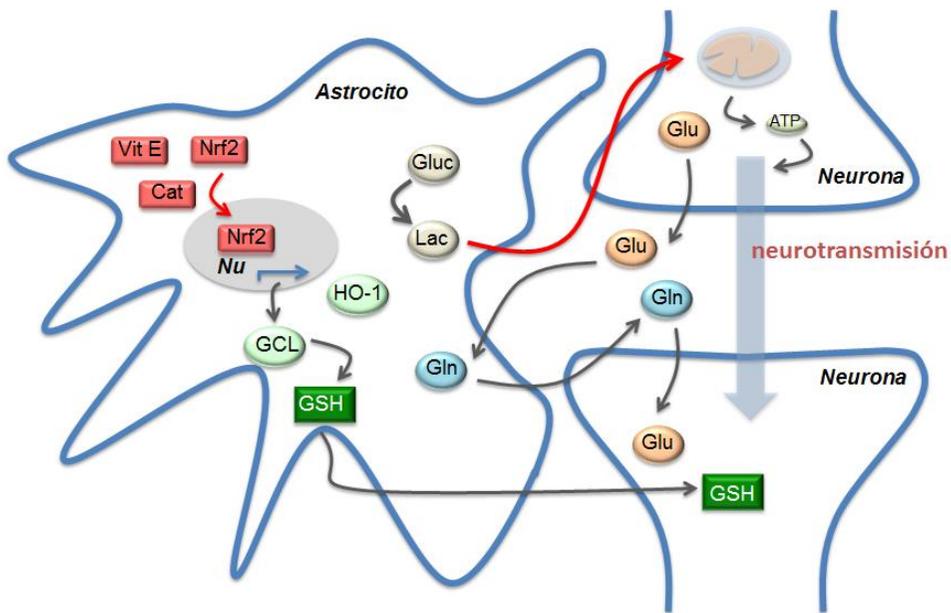


Figura 7. Acoplamiento metabólico entre neuronas y astrocitos

Los astrocitos convierten la glucosa en lactato, que se libera al espacio sináptico, para ser posteriormente captado por las neuronas. Las neuronas utilizan el lactato en el ciclo de Krebs para la producción de ATP, que usan durante el proceso de neurotransmisión. En el proceso de neurotransmisión las neuronas liberan glutamato, que es captado por los astrocitos y convertido en glutamina. Los astrocitos liberan glutamina al espacio sináptico para que la absorban las neuronas. Las neuronas convierten glutamina en glutamato para ser usado como neurotransmisor. Los astrocitos presentan elevados niveles de antioxidantes, como vitamina E, catalasa, y el factor transcripcional NRF2, que en respuesta a estrés oxidativo induce la expresión de genes antioxidantes, tales como *HO-1* y *GCL*. Este proceso permite la generación de GSH, principal sistema antioxidante en cerebro. Los astrocitos envían los precursores para la síntesis de GSH a las neuronas, puesto que estas carecen de la maquinaria necesaria.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



1. HIPÓTESIS

Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, especialmente en el caso de las enfermedades neurodegenerativas. Por tanto, su producción en cerebro debe estar altamente controlada. Dada su actividad señalizadora, no resultaría extraño observar diferencias en la producción de ROS relacionadas con la fisiología de los distintos tipos celulares neurales.

Así, partimos de la hipótesis de que el cerebro debe disponer de un sistema regulador específico de la producción de ROS que explique las diferencias metabólicas y fisiológicas entre las distintas células neurales.

2. OBJETIVOS

A la vista de los antecedentes descritos y de acuerdo a nuestra hipótesis, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar la producción de O_2^- y H_2O_2 en neuronas y astrocitos, e identificar el sitio principal de su formación y regulación.
2. Establecer la relación existente entre la producción de ROS y el rol metabólico y fisiológico de las diferentes células neurales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS



1. ANIMALES

Las ratas Wistar y los ratones C57Bl6, CD-1 y CBA-J se suministraron por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. La cría de los animales se realizó en jaulas, manteniéndose en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (luz de 08:00 a 20:00 h). La humedad se conservó en torno al 45-65%, con una temperatura entre 20-25°C. La alimentación de los animales fue *ad libitum* con una dieta sólida estándar (proteínas 17%; lípidos 3%; componente glucídico 58.7%; celulosa 4.3%; minerales 5% y 12% de humedad) y acceso libre al agua.

La gestación se controló limitando la cohabitación de hembras con machos a una noche. A la mañana siguiente se inspeccionó la presencia de tapón vaginal, indicador de copulación, considerándose este día como el primero de la etapa gestacional.

Todas las manipulaciones y los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con la normativa vigente en Legislación Española (Ley 6/2013) en relación al cuidado de los animales de experimentación. Todos los protocolos realizados en esta Tesis han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

2. CULTIVOS PRIMARIOS

2.1 Neuronas Corticales

Para la obtención de cultivos primarios de neuronas corticales se utilizaron ratonas de 15.5 días de gestación, o ratas Wistar de 16.5 días¹³⁴. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical previa anestesia en atmósfera de CO₂. Los embriones se extrajeron tras histerectomía y se trasladaron a la cabina de flujo laminar. Los hemisferios cerebrales se aislaron con ayuda de pinzas y tijeras, y se colocaron en una placa de cultivo en presencia de solución de disgregación (EBSS (*Eagle's Basal Salt Solution*): NaCl 116 mM; KCl 5.4 mM; NaH₂PO₄ 1.01 mM; MgSO₄ 1.5 mM; NaHCO₃ 26 mM; Glucosa 4 mM; Rojo Fenol 10 mg/ml, con DNAsa 20 µg/ml; BSA (seroalbúmina bovina) 2.94 mg/ml; pH 7.15). Se cortaron con ayuda de un bisturí y el tejido parcialmente disgregado se trasvasó a un tubo cilíndrico donde se decantó. Se aspiró el sobrenadante, reemplazándose por solución de tripsinización (EBSS; DNAsa 50 µg/ml; BSA 3.15 mg/ml; Tripsina 10 mg/ml; pH 7.15). La digestión enzimática se realizó en un baño termostático a 37°C durante 15 minutos, con agitación suave. La tripsinización se detuvo añadiendo 10% (v/v) de suero fetal (SF). La suspensión celular se centrifugó a 500 g durante 5 minutos.

Las células sedimentadas se resuspendieron en 12 ml de solución de disgregación con ayuda de una pipeta Pasteur previamente siliconada y redondeada a la llama. El sobrenadante obtenido tras la decantación de la solución disgregada se recolectó, y un nuevo ciclo de disociación celular se aplicó al tejido con 9 ml de solución de disgregación. Ambos sobrenadantes se centrifugaron (500 g durante 5 min) para sedimentar las células. Las células se resuspendieron en medio de cultivo específico para el crecimiento neuronal (Neurobasal (Life Technologies); B27 (Life Technologies) 2%;

glutamina 2mM; antibiótico: penicilina G 100 U/ml; estreptomina 100 µg/ml; anfotericina B 0.25 µg/ml). Se realizó el conteo de las células viables, tras la tinción de la suspensión celular con azul de tripano (suspensión celular 10 µl; medio de cultivo 30 µl; azul de tripano 40 µl), empleando la cámara cuenta glóbulos y el microscopio de contraste de fases.

La densidad de siembra fue de $2 \cdot 10^5$ células/cm², sobre placas de cultivo previamente tratadas con 10 µg/ml de poli-D-lisina (PDL). Las células se mantuvieron en un incubador termostatzado a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Al tercer día en cultivo el medio se reemplazó por medio fresco. Las células se utilizaron en el día 7. En estas condiciones la pureza del cultivo, determinada mediante inmunocitoquímica frente a un marcador específico neuronal, MAP2 (*Microtubule-Associated Protein 2*), y GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), específico de astrocitos, fue del 96% (**Figura 8**). Véase **Tabla 4** para la información relativa a los anticuerpos empleados.

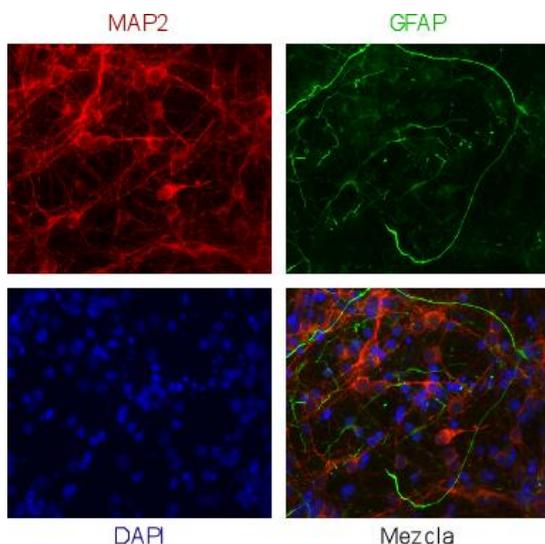


Figura 8. Neuronas corticales en cultivo primario

Inmunocitoquímica de neuronas corticales de ratón C57Bl6 en cultivo primario frente a MAP2 (rojo) y GFAP (verde). DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) como marcador de núcleos (azul). Se observó una pureza del cultivo del 96%. (n=3)

2.2 Astrocitos Corticales

Los cultivos primarios de astrocitos, tanto de rata como ratón, se realizaron a partir de neonatos de 1 día de vida ¹³⁴. Los animales se limpiaron con etanol al 70%, se decapitaron, y las cabezas se trasladaron a la cabina de flujo laminar. El cráneo se abrió con ayuda de pinzas y tijeras, el cerebelo y el bulbo olfatorio se eliminaron, y los hemisferios cerebrales se purificaron mediante la eliminación de las meninges y los vasos sanguíneos. El tejido se colocó en una placa de cultivo con solución de disgregación. La suspensión celular se obtuvo como previamente se describió para el cultivo primario de neuronas.

Las células se sembraron en DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*) (con antibiótico) suplementado con SF al 10% (v/v) a razón de 3-4 cerebros por frasco de cultivo de 175 cm². Las células se mantuvieron en un incubador termostatzado a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó por medio fresco a las 24 horas del cultivo y cada 2-3 días. A día 7 las células se agitaron durante 16 horas en un agitador orbital, colocado en el interior de un incubador de CO₂, a 180 rpm. La finalidad fue eliminar la microglía y los oligodendrocitos, puesto que estas células se separan del cultivo durante el agitado, permaneciendo los astrocitos adheridos. Los astrocitos, que quedaron adheridos, se resembraron en placas de cultivo celular a una densidad de 0.5-1·10⁵ células/cm², dependiendo de las necesidades experimentales. Las células se utilizaron en el día 14. La pureza del cultivo fue del 95%, determinada mediante inmunocitoquímica frente GFAP (**Figura 9**). Véase **Tabla 4** para la información relativa a los anticuerpos empleados.

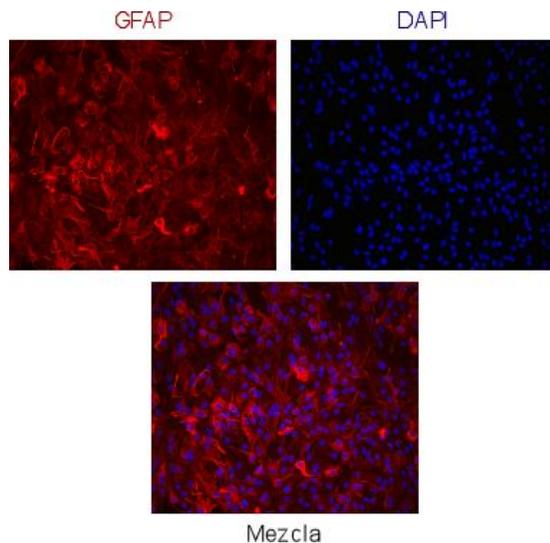


Figura 9. Astrocitos corticales en cultivo primario

Inmunocitoquímica de astrocitos corticales de rata Wistar en cultivo primario frente a GFAP (rojo). DAPI como marcador de núcleos (azul). Se observa una pureza del cultivo del 95%. (n=3)

2.3 Cocultivos de Neuronas y Astrocitos Corticales

Para la realización de cocultivos de neuronas y astrocitos corticales, las células se obtuvieron como previamente se ha descrito. Las neuronas se sembraron en placas multipocillo. A las 24 horas del cultivo de neuronas, los astrocitos se resembraron sobre insertos de membrana semipermeable, de 0.4 μm de tamaño de poro (Millipore) y 4.67 cm² de superficie, en medio de crecimiento neuronal, colocándose los insertos sobre las neuronas. Al tercer día, el medio del cocultivo se reemplazó por medio de crecimiento neuronal fresco. Las células se recogieron en el día 7 en cultivo de neuronas, correspondiente al día 14 en cultivo de astrocitos.

3. TRANSFECCIONES CELULARES

3.1 Sobreexpresiones

Los astrocitos se transfectaron con la finalidad de sobreexpresar cDNA (DNA de cadena complementaria), 24 horas antes de su uso (día 13) con lipofectamina LTX-PLUS Reagent (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo se basa en la incubación del DNA plasmídico con lipofectamina y el reactivo PLUS Reagent, en medio OptiMEM. La mezcla se incubó con las células durante 24 horas. La expresión de los cDNA se verificó mediante transferencia tipo Western.

Con la finalidad de seleccionar las células transfectadas mediante citometría de flujo, o bien valorar la eficiencia de transfección mediante microscopía, se utilizaron vectores que expresaban GFP, en conjunción con los vectores deseados, realizando para ello cotransfecciones en una relación 1:9 cuando el vector no expresaba el epítipo.

Los vectores plasmídicos utilizados (**Tabla 2**) se obtuvieron tras la transformación de bacterias *Escherichia coli*, cepa DH5 α , mediante choque térmico. La extracción y purificación de los plásmidos se realizó empleando el estuche comercial Wizard Plus MIDIPrep (Promega).

Tabla 2. Vectores plasmídicos utilizados

| Plásmido | Proteína | Epítipo | Casa Comercial |
|-------------------------|--------------|---------|----------------|
| NDUFS1 | NDUFS1 | | Origene |
| pcDNA3.1(+) | | | Invitrogen |
| peGFPc1 | | GFP | Clontech |
| pIRES2eGFP | | GFP | Clontech |
| pIRES2eGFP-mitoCatalasa | mitoCatalasa | GFP | |

3.2 Silenciamientos mediante siRNA

Para reducir la expresión de específica de ciertas proteínas se emplearon siRNAs (ácido ribonucleio (RNA) pequeño de interferencia). Los siRNA se introdujeron en las células mediante transfección, empleando para ello la tecnología de los liposomas. Se utilizó lipofectamina RNAiMAX (Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración final del siRNA en las células fue de 9 nM, durante 3 días. Los silenciamientos proteicos se verificaron mediante transferencia tipo Western o reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR).

Los siRNA utilizados quedan recogidos en la **Tabla 3**.

Tabla 3. siRNA utilizados

| Proteína | Referencia | Casa comercial |
|---------------------|-----------------|-------------------|
| NDUFS1 | 4390771 s105592 | Life Technologies |
| p22 ^{phox} | 4390771 s64648 | Life Technologies |
| Control | 4390843 | Life Technologies |

4. TRATAMIENTOS CELULARES

Los astrocitos en cultivo primario se trataron durante 24 horas con GSH etil éster (GSH-EE) con la finalidad de reducir las ROS en la célula. Para ello se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco con GSH-EE 5 mM 24 horas antes de la utilización de las células. A las células control se les reemplazó el medio con medio fresco en ausencia de GSH.

Así mismo, los cultivos primarios de neuronas y astrocitos se trataron con el inhibidor del complejo II mitocondrial ácido 3-nitropropiónico (3NP), a la concentración de 0.5 y 1 mM durante una hora, previa a la recolección celular.

5. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

5.1 Peróxido de Hidrógeno

La velocidad de producción de H_2O_2 se determinó empleando el reactivo AmplexRed (Life Technologies). Para ello las células, o las mitocondrias aisladas en fresco (5 μ g), se incubaron con el reactivo AmplexRed (Life Technologies) (9.45 μ M) en medio *Krebs Ringer Phosphate Glucose Buffer* (KRPB: NaCl 145 mM; Na_2HPO_4 5.7 mM; KCl 4.86 mM; $CaCl_2$ 0.54 mM; $MgSO_4$ 1.22 mM; glucosa 5.5 mM; pH 7.35), en presencia de peroxidasa de rábano (0.1 U/ml) durante 2 horas. Cada 30 minutos se determinó la luminiscencia a una longitud de excitación/emisión de 538/604 nm. Las pendientes obtenidas se utilizaron para los cálculos de la velocidad de producción. Se emplearon disoluciones estándar de concentración conocida de H_2O_2 . La reacción del reactivo AmplexRed con H_2O_2 presenta una estequiometría 1:1.

Con la finalidad de determinar la contribución de la xantina oxidasa, y/o las NOX en la producción de ROS, las células se incubaron en presencia de los inhibidores alopurinol y VAS2870 (1-100 μ M) durante la determinación.

5.1.1 H_2O_2 en gel

Para evaluar la velocidad de producción de H_2O_2 en geles provenientes de electroforesis nativas, pequeñas porciones de gel se depositaron en pocillos de placas de 96 pocillos. La mezcla de reacción en estas condiciones fue la empleada para células o mitocondrias aisladas suplementada con 20 μ M de NADH y 40 U/ml de SOD. La producción se evaluó durante 50 minutos realizándose lecturas cada 5 minutos.

5.2 Superóxido

Los niveles $O_2^{\cdot-}$ mitocondriales se determinaron empleando la sonda fluorescente Mitosox (Life Technologies). Para ello las células se incubaron en presencia de 2 μ M de Mitosox en tampón *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS: NaCl 134.2 mM; KCl 5.26 mM; KH_2PO_4 0.43 mM; $NaHCO_3$ 4.09 mM; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0.33 mM; glucosa 5.44 mM; HEPES

(ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico) 20 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 mM; pH 7.4) durante 30 minutos a 37°C. La fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo en unidades arbitrarias (u.a.). En determinados experimentos, las determinaciones se realizaron previa selección de poblaciones celulares identificadas mediante marcaje fluorescente con GFP.

Para estimular la producción de $\text{O}_2^{\cdot -}$ por la mitocondria, se realizaron incubaciones con antimicina A o rotenona durante 15 minutos (10 μM) durante el periodo de incubación de la sonda Mitosox.

La colocalización de la sonda Mitosox en la mitocondria se corroboró mediante microscopía confocal (confocal *spinning disk* Roper Scientific con microscopio Olympus IX81). Para ello el Mitosox se incubó en presencia de la sonda Cytopainter Mitochondrial Staining Kit Green (Abcam) (1/1000). El protocolo seguido para el cultivo de las células, fijado y montaje fue el mismo que el empleado en inmunocitoquímica (véase 8.1).

6. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

El $\Delta\Psi_m$ se determinó utilizando la sonda DiIC1(5) (Life Technologies) mediante citometría de flujo. Esta sonda, dado su carácter catiónico, se acumula en las mitocondrias polarizadas, por lo que la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional al $\Delta\Psi_m$. Las células se despegaron, resuspendieron en tampón fosfato salino (PBS: NaCl 136 mM; KCl 2.7 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.8 mM; KH_2PO_4 1.7 mM; pH 7.4) con 50 nM de la sonda, y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en un baño con agitación suave. El $\Delta\Psi_m$ se determinó en u.a., estableciendo el valor basal tras la incubación de las células, una vez analizadas, con el desacoplante mitocondrial CCCP (cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona) (10 μM) durante 15 minutos. El efecto de los inhibidores de la cadena transportadora, antimicina A o rotenona, sobre el $\Delta\Psi_m$ se determinó mediante su incubación (10 μM) durante 15 minutos, estableciéndose el valor basal con el desacoplante CCCP. En determinados experimentos, las determinaciones se realizaron previa selección de poblaciones celulares identificadas mediante marcaje fluorescente con GFP.

7. ESTUDIOS *EX VIVO*

Con la finalidad de analizar las poblaciones celulares cerebrales *in vivo* se realizaron dos abordajes experimentales. El primero de ellos está basado en la disgregación tisular y posterior marcaje de las poblaciones. En el segundo se empleó la expresión controlada de marcadores de selección celular-específicos y la posterior disgregación tisular. En ambos casos, tras la separación, diferentes parámetros celulares se evaluaron mediante citometría de flujo.

7.1 Disgregación tisular y selección de células Integrina-β5⁺

Se realizó la disgregación celular de cerebros adultos (dos machos y una hembra), con pequeñas modificaciones sobre el protocolo establecido por Subbalakshmi y Murthy¹³⁵. Para ello, se extrajeron los cerebros de los animales adultos, seleccionándose la región de la corteza, que fue cortada en unas 10-12 porciones. Las porciones se incubaron a 37°C durante 90 minutos en medio basal (glucosa 8% (p/v); fructosa 5% (p/v); KH₂PO₄-NaOH 10 mM; pH 6) suplementado con 2% de ficoll y 0.1% de tripsina acetilada. La tripsinización se detuvo tras la adición de soybean (1 mg/ml). La disgregación del tejido se realizó mediante resuspensiones utilizando una pipeta de 1 ml con la punta cortada. A continuación el tejido se agitó, empleando el vortex, y pasó por membranas de nylon de 280-70-40 μm de tamaño de poro. La suspensión celular se centrifugó a 720 g durante 15 minutos. El sedimento celular se resuspendió en medio basal con 9% de ficoll y centrifugó a 720 g durante 10 minutos. El sobrenadante (S1) se diluyó 1:1.125 en medio basal con 2% de ficoll y centrifugó a 1120 g durante 20 minutos, el sedimento (P2) se resuspendió en 17% de ficoll en medio basal. El sedimento de la centrifugación anterior (P1), enriquecido en cuerpos neuronales, se resuspendió en 32% de ficoll. Los sedimentos (P1 y P2) se centrifugaron a 8500 g durante 10 minutos, para obtener sedimentos enriquecidos en cuerpos neuronales y astrocitos, respectivamente. Ambos sedimentos se unieron con la finalidad de obtener una única fracción cerebral enriquecida en cuerpos neuronales y astrocitos.

A continuación, las células se marcaron con el anticuerpo anti-Integrina-β5 (1/500; eBioscience) durante 1.5 horas. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario marcado en verde (1/500; Alexa-488 Burro anti-ratón, Abcam ab150105), en presencia de MitoSox (2 μM) o DiIC1(5) (50 nM), durante 30 minutos a 37°C en un baño termostatzado con agitación suave.

El O₂⁻ y el ΔΨ_m se analizaron mediante citometría de flujo en la población de células Integrina-β5 positivas o negativas.

7.2 Disgregación tisular en cerebros marcados con GFP

Para poder abordar el estudio de la producción de O₂⁻ en las células neuronales y astrocíticas en cerebro, se procedió al marcaje de las distintas poblaciones mediante la expresión de GFP. Para ello, se realizaron inyecciones estereotáxicas de adenovirus (AAV) que inducen la expresión de GFP bajo el promotor neuronal (PGK: fosfoglicerato quinasa) o astrocítico (ABCD1: *ATP-binding cassette, sub-family D, member 1*).

A ratones macho (n=8) de 9 semanas de edad se inyectaron 3 μl de AAV en el cortex somatosensorial (AP: -0.7 mm; L: +/- 3 mm; V: -0.6 mm), el neuronal en el hemisferio derecho, y el astrocítico en el izquierdo. Los animales se sacrificaron a partir de las 12 semanas de edad. Las inyecciones se realizaron en el laboratorio del Doctor Bonvento (Francia).

Los cerebros se extrajeron y cortaron en fracciones de 1 mm de grosor utilizando una matriz coronal, descartándose las 2 primeras fracciones, y seleccionando las 5

siguientes, correspondientes a la zona de la corteza. A continuación los hemisferios se separaron, realizándose una extracción para cada hemisferio por cada animal estudiado.

La disgregación celular se realizó empleando el protocolo del estuche comercial *Neuronal Tissue Dissociation* (P) (Miltenyi). Una vez se separaron las células la acumulación de O_2^- se analizó mediante MitoSox por citometría de flujo en las células GFP⁺. De esta forma se pudo establecer, para cada animal, la acumulación de O_2^- en las células neuronales y astrocíticas.

8. INMUNOFLUORESCENCIA

La identificación proteica de células en cultivo o en tejidos se realizó mediante inmunocitoquímica e inmunohistoquímica, empleando anticuerpos conjugados a proteínas fluorescentes.

Las imágenes se tomaron en los microscopios Nikon Eclipse Ti invertido y confocal *spinning disk* Roper Scientific con microscopio Olympus IX81. El montaje de las imágenes se realizó mediante el software Adobe Photoshop.

8.1 Inmunocitoquímica

Las células se sembraron sobre cristales, previamente tratados con poli-L-ornitina (15 μ g/ml) y fibronectina (1 μ g/ml) (neuronas) o PDL (astrocitos). Se realizaron lavados con PBS, y las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. A continuación se realizaron varios lavados con PBS, y PBS con Tritón X-100 al 0.2%. Las células se bloquearon durante 1 hora (Tritón X-100 0.2%; BSA 1% en PBS) con suero al 5%, de la misma especie que los anticuerpos secundarios empleados durante la detección. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4°C (Tritón X-100 0.2%; BSA 1%; suero 2% en PBS). Los anticuerpos secundarios, conjugados a fluoróforos, se incubaron 1 hora a temperatura ambiente (Tritón X-100 0.2%; BSA 1%; suero 2% en PBS), junto con DAPI (1/10000), lo que permitió el marcaje de los núcleos. En la **Tabla 4** se encuentra la relación de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección.

El montaje se realizó sobre portaobjetos en presencia de Fluoromount (Sigma).

8.2 Inmunohistoquímica

Los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal, con una mezcla compuesta por 3:2 ketamina e hidrocortato de xilacina, en una proporción 1 ml/kg de peso corporal. A continuación se realizó la perfusión vía intracárdica, primero con 17 ml de NaCl al 0.9% durante 1 minuto, y a continuación con 250 ml de fijador Somogy (paraformaldehído despolimerizado 4% (p/v); ácido pícrico 0.2% (v/v) en 0.1 M de tampón fosfato (Na_2HPO_4 ; NaH_2PO_4); pH 7.4) durante 15 minutos.

Los cerebros se extrajeron, y se postfijaron durante 2 horas a temperatura ambiente con Somogy, lavándose posteriormente con tampón fosfato (0.1 M). A continuación, los cerebros se sumergieron en tres soluciones de sacarosa al 10-20-30% (en tampón fosfato) hasta su equilibrado.

Se realizaron cortes de 20 μm con el criostrato. Para ello los cerebros se endurecieron, en presencia de OCT y congelación. Las secciones se recogieron de forma seriada, realizándose cortes coronales, depositándose sobre portaobjetos.

Los anticuerpos primarios se incubaron en tampón fosfato (0.1M) con suero (10%) y Tritón X-100 al 0.2% durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. La incubación de los anticuerpos secundarios se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad (tampón fosfato 0.1M). A continuación se realizó el marcaje de los núcleos con DAPI, incubándose 1/7000 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se cubrieron con cubreobjetos depositados sobre Fluoromount.

La relación de anticuerpos primarios y secundarios empleados puede encontrarse en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios empleados

En la Tabla queda recogida la relación de anticuerpos empleados en inmunofluorescencia.

| Anticuerpos primarios | | | | | |
|------------------------------|-------------------|----------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
| Anticuerpo | Técnica | Especie | Dilución | Referencia | Casa Comercial |
| MAP2 | Inmunocitoquímica | Ratón | 1/500 | M1406 | Sigma |
| GFAP | Inmunocitoquímica | Conejo | 1/200 | G9269 | Sigma |

| Anticuerpos secundarios | | | | | |
|--------------------------------|----------------------|----------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
| Anticuerpo | Especificidad | Especie | Dilución | Referencia | Casa Comercial |
| Alexa 594 | Anti-Ratón | Cabra | 1/500 | A11032 | Invitrogen |
| Alexa 488 | Anti-Conejo | Cabra | 1/500 | A11008 | Invitrogen |

9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA

La concentración de proteínas en las muestras se determinó mediante el ensayo del BCA o ácido bicinónico, empleando el estuche comercial de Pierce (Thermo Scientific). Las muestras se incubaron con el reactivo de manera que la presencia de proteínas genera un cambio de coloración que es posible valorar espectrofotométricamente (562 nm). La concentración se determinó en relación a la recta patrón de concentración conocida de BSA.

10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE ENZIMAS MITOCONDRIALES

Las actividades específicas de las enzimas mitocondriales, complejos enzimáticos de la cadena de transporte mitocondrial, y citrato sintasa, se evaluaron a partir de cultivos

primarios de neuronas y astrocitos. Para ello las células se recogieron mediante tripsinización, se centrifugaron (500 g durante 5 minutos) y el sedimento se resuspendió en tampón fosfato potásico (KH_2PO_4 0.1 M; pH 7). La ruptura celular se realizó mediante 3 ciclos de congelación-descongelación en N_2 líquido-baño termostatzado a 37°C.

Los experimentos se realizaron a partir de, como mínimo, 3 réplicas biológicas, estableciéndose para cada condición dos réplicas experimentales, y cada réplica experimental fue determinada, al menos, tres veces.

10.1 Complejo I

Para la determinación de la actividad específica del complejo I mitocondrial se emplearon de 100-200 μg de proteína celular, a excepción de la determinación a partir de cultivos primarios de astrocitos Wistar, donde se utilizaron de 10-50 μg de proteína.

La actividad específica se determinó en tampón fosfato (KH_2PO_4 20 mM; pH 7.2) con 8 mM de MgCl_2 , en presencia de 2.5 mg/ml de BSA, 0.15 mM de NADH, y 1 mM de KCN a 30°C. Variaciones en la absorbancia (Abs) (340 nm) se valoraron tras la adición de 50 μM de ubiquinona, y posterior adición de 10 μM de rotenona. De esta forma la actividad se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula (**Fórmula 1**), donde ϵ representa al coeficiente de extinción molar del NADH ($6.81 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Fórmula 1. Fórmula para la determinación de la actividad específica del complejo I

$\Delta\text{Abs}/\text{min}$ representa la pendiente del tramo tras la adición de la ubiquinona, menos la pendiente del tramo tras la adición de la rotenona; v_f se refiere al volumen final de la reacción, mientras que v_m es el volumen de muestra; ϵ_{NADH} es el coeficiente de extinción molar del NADH. ($\text{nmol}/\text{min} \cdot \text{mg}$)

$$\text{Actividad} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right) = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{min}}{\epsilon_{\text{NADH}}} \cdot \frac{v_f}{v_m} \cdot 1000 \cdot \frac{1}{\text{mg}/\text{ml} \text{ proteína}}$$

El porcentaje del complejo I en su forma desactivada se determinó tras el bloqueo de la transición A/D con N-etilmaleimida (NEM). Para ello, los homogenados celulares se incubaron 15 minutos a 15°C en presencia de 10 μM de NEM. A continuación, se valoró la actividad del complejo I. Los valores obtenidos en presencia de NEM se referenciaron a la actividad determinada en condiciones normales, correspondiendo la diferencia en la actividad al % de complejo I en la forma desactivada presente en las muestras.

10.2 Complejo II

La actividad específica del complejo se determinó a partir de 100-200 μg de proteína. La reacción se estableció en tampón fosfato (KH_2PO_4 20 mM; pH 7.2) con 8 mM de MgCl_2 , en presencia de 2.5 mg/ml de BSA, 10 mM de succinato, 3 mM de KCN, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antimicina A, 5 μM de rotenona, y 0.03 mM de DCPIP (2,6-diclorofenol indofenol) a 30°C y 600 nm. Se añadieron 50 μM de ubiquinona para disparar la reacción⁸³. La actividad se calculó de acuerdo a la **Fórmula 2**.

Fórmula 2. Fórmula para la determinación de la actividad específica del complejo II

$\Delta\text{Abs}/\text{min}$ representa la pendiente tras la adición de ubiquinona; v_f se refiere al volumen final de la reacción, mientras que v_m es el volumen de muestra; ϵ_{DCPIP} es el coeficiente de extinción molar del DCPIP ($19.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ($\text{nmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)

$$\text{Actividad } (\text{nmol}/\text{min}\cdot\text{mg}) = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{min}}{\epsilon_{\text{DCPIP}}} \cdot \frac{v_f}{v_m} \cdot 1000 \cdot \frac{1}{\text{mg}/\text{ml} \text{ proteína}}$$

10.3 Complejo II-III

Para la determinación de la actividad específica del complejo II-III se utilizaron 60-120 μg de proteínas. La reacción tuvo lugar en presencia de tampón fosfato (KH_2PO_4 100 mM) con 0.6 mM de EDTA (K^+) (ácido etilendiaminotetraacético), 2 mM de KCN y 200 μM de citocromo *c*. Variaciones en la absorbancia con el tiempo a 550 nm y 30°C se evaluaron tras la adición de 20 mM de succinato, y posterior adición de 10 μM de antimicina A. La actividad se calculó de acuerdo a la **Fórmula 3**.

Fórmula 3. Fórmula para la determinación de la actividad específica del complejo II-III

$\Delta\text{Abs}/\text{min}$ representa la pendiente del tramo tras la adición del succinato menos la pendiente de tramo posterior a la adición de antimicina A; v_f se refiere al volumen final de la reacción, mientras que v_m es el volumen de muestra; $\epsilon_{\text{Cit } c}$ es el coeficiente de extinción molar del citocromo *c* ($19.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ($\text{nmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)

$$\text{Actividad } (\text{nmol}/\text{min}\cdot\text{mg}) = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{min}}{\epsilon_{\text{Cit } c}} \cdot \frac{v_f}{v_m} \cdot 1000 \cdot \frac{1}{\text{mg}/\text{ml} \text{ proteína}}$$

10.4 Complejo IV

Para conocer la actividad del complejo estudiamos la constante de velocidad (k) de la reacción de oxidación del citocromo *c*, en base a la siguiente fórmula (**Fórmula 4**).

Fórmula 4. Fórmula para la determinación de la constante de velocidad (k) de oxidación del citocromo *c* por el complejo IV

Corresponde a la media de las k obtenidas a diferentes tiempos (1, 2 y 3 minutos). ($k \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)

$$k (\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}) = \bar{X}_{t=1,2,3} \left(\frac{\ln\left(\frac{\text{Abs}_t}{\text{Abs}_{t_0}}\right)}{t} \cdot \frac{1}{\text{mg}} \right)$$

En tampón fosfato (KH_2PO_4 10 mM), en presencia de 50 μM de citocromo *c* reducido, se determinó la absorbancia de las muestras a 550 nm y 30°C, a partir de 60-120 μg de proteínas, al tiempo inicial (t_0) y a 1, 2 y 3 minutos. Los valores de absorbancia se refirieron al blanco, que se corresponde con la misma mezcla de reacción en presencia de 1 mM de ferricitanida- K^+ .

El citocromo *c* (10 mg/ml) se redujo en presencia de 10 mM de ascorbato. Para seleccionar el citocromo *c* reducido la disolución se hizo pasar por una columna PD-10, Sephadex, G-25M, previamente equilibrada en tampón fosfato (KH₂PO₄). La elución se realizó en tampón fosfato.

La concentración de citocromo *c* reducido se calculó a partir de su absorbancia a 550 nm, en presencia de 95 mM de tampón fosfato (KH₂PO₄) de acuerdo a la **Fórmula 5**, referenciándola a la absorbancia del citocromo *c* en las mismas condiciones y en presencia de ferricianida-K⁺ 1 mM (blanco).

Fórmula 5. Fórmula para el cálculo de la concentración de citocromo *c*

Se realiza la diferencia en la absorbancia de la muestra frente al blanco; *v_f* se refiere al volumen final de la reacción, mientras que *v_m* es el volumen de citocromo *c*; $\epsilon_{Cit\ c}$ es el coeficiente de extinción molar del citocromo *c* (19.2 mM⁻¹cm⁻¹). (mM)

$$Citocromo\ c\ (mM) = \frac{Abs_{muestra-blanco} \cdot v_f}{\epsilon_{Cit\ c} \cdot v_m}$$

10.5 Citrato Sintasa

La actividad específica de la citrato sintasa se determinó a partir de 30-60 µg de proteínas en presencia de 93 mM de Tris-HCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.2 mM acetil-CoA, 0.2 mM DTNB (ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoico). La reacción se desencadenó con la adición de 0.2 mM de oxalacetato. La actividad se calculó de acuerdo a la **Fórmula 6**, a 412 nm y 30°C.

Fórmula 6. Fórmula para la determinación de la actividad específica de la citrato sintasa

$\Delta Abs/min$ representa la pendiente del tramo tras la adición del oxalacetato; *v_f* se refiere al volumen final de la reacción, mientras que *v_m* es el volumen de muestra añadido; ϵ_{DTNB} es el coeficiente de extinción molar del DTNB (13.6 mM⁻¹cm⁻¹). (nmol/min·mg)

$$Actividad\ (nmol/min \cdot mg) = \frac{\Delta Abs/min}{\epsilon_{DTNB}} \cdot \frac{v_f}{v_m} \cdot 1000 \cdot \frac{1}{mg/ml\ proteina}$$

11. PURIFICACIÓN Y SOLUBILIZACIÓN MITOCONDRIAL

Con la finalidad de evaluar mediante diferentes parámetros a la mitocondria, su purificación resultó necesaria. Para ello se realizaron diferentes protocolos dependiendo del grado de pureza deseado y/o la cantidad necesaria. La pureza de las mitocondrias obtenidas se evaluó mediante la determinación de la actividad específica de la citrato sintasa (**Figura 10**).

11.1 Centrifugación diferencial

El protocolo seleccionado para obtener mitocondrias en grandes cantidades fue el descrito en Acín-Pérez *et al.*⁸⁰. Las células se homogenizaron empelando el homogenizador Potter-Elvehjem de vidrio-teflon en Tampón A (sacarosa 83 mM; MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 10 mM; pH 7.2) realizado 10 golpes con el homogenizador eléctrico. El mismo volumen de Tampón B (sacarosa 250 mM; MOPS 30 mM; pH 7.2) se añadió a las muestras homogenizadas, que se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos para eliminar núcleos y células no rotas. El sobrenadante se centrifugó a 12000 g durante 2 minutos, obteniéndose en el sedimento la fracción mitocondrial, que se lavó en Tampón C (sacarosa 320 mM; EDTA 1mM; Tris-HCl 10 mM; pH 7.4), mediante centrifugación en las mismas condiciones. Las mitocondrias se resuspendieron en Tampón D (ácido 6-aminohexanoico 1M; Bis-Tris/HCl 50 mM; pH 7).

11.2 Gradiente de Percoll

Este fue el protocolo de elección cuando se necesitaron mitocondrias de mayor pureza, como podemos observar en el incremento de la actividad de la citrato sintasa por proteína, respecto al protocolo basado en la centrifugación diferencial (**Figura 10**). Para ello, las células se homogenizaron en tampón MSEGTA (manitol 225 mM; sacarosa 75 mM; HEPES 20 mM; EGTA (ácido etilenglicoltetraacético) 1 mM; 0.2% (p/v) BSA; pH 7.4) y se centrifugaron a 2000 g durante 4 minutos. El sobrenadante se recogió y centrifugó a 12000 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en MSEGTA y se depositó sobre una solución al 25% (v/v) Percoll/MSEGTA (la solución de Percoll contiene: manitol 225 mM; sacarosa 75 mM; HEPES 20 mM; EGTA 1mM disuelto en Percoll pH 7.4). La suspensión se centrifugó a 30000 g durante 10 minutos, recogiendo la fracción mitocondrial pura en la parte inferior del tubo. Las mitocondrias se resuspendieron en MSEGTA sin BSA, y se lavaron 2 veces, mediante centrifugación a 12000 g durante 10 minutos. La fracción mitocondrial pura se resuspendió en el tampón MS (manitol 225 mM; sacarosa 75 mM; HEPES 20 mM; pH 7.4)¹³⁶.

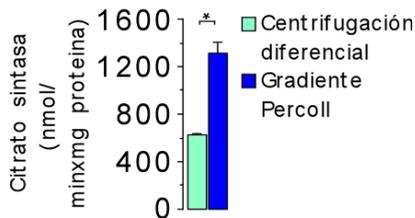


Figura 10. Determinación de la actividad de la citrato sintasa en mitocondrias purificadas

La actividad de la citrato sintasa se determinó a partir de mitocondrias purificadas, a partir de cultivos de neuronas de ratones C57Bl6, mediante centrifugación diferencial, o gradiente de Percoll. (n=2)

11.3 Solubilización

Una vez se obtuvieron las mitocondrias, se procedió a su solubilización, empleando para ello digitonina. Se trata de un detergente suave que mantiene intactas las interacciones entre las proteínas, por lo que mantiene la organización de los complejos proteicos. La dosis utilizada fue de 4 g/g de acuerdo a Acín-Pérez *et al.*⁸⁰. Las

mitocondrias purificadas se incubaron 5 minutos en hielo y se centrifugaron a 13000 g durante 30 minutos, en presencia de digitonina, obteniéndose en el sobrenadante las mitocondrias solubilizadas.

12. RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

A partir de extractos mitocondriales se determinó el consumo de oxígeno. Para ello, se purificaron las mitocondrias mediante el protocolo de centrifugación diferencial (véase apartado 11.1), resuspendiéndose las mitocondrias en tampón de respiración (KCL 125 mM; KH₂PO₄ 2 mM; MgCl₂ 1 mM; BSA 0.5 mg/ml; HEPES 10 mM; pH 7.4).

El consumo de oxígeno a partir de piruvato/malato (5 mM) en presencia de 1 mM de ADP, se valoró con el electrodo de oxígeno Clark (Rank Brothers). El electrodo se calibró con el tampón de respiración oxigenado, considerándose el valor obtenido como 200 μ M de oxígeno, y 0 μ M en presencia de ditionito sódico.

La determinación se llevó a cabo introduciendo en la cámara del electrodo (1 ml) las mitocondrias purificadas, añadiéndose a continuación el sustrato (piruvato/malato), y el ADP. El consumo de oxígeno se expresó en pmol/min \cdot μ g.

13. LISIS CELULAR

Extractos proteicos totales de las células se obtuvieron mediante su lisado en solución RIPA (Na₂HPO₄ 12.5 mM; Triton X-100 1%; SDS (dodecilsulfato sódico) 1%; EDTA 2 mM; NaCl 150 mM; pH 7). Para ello las células se lavaron con PBS, y a continuación se rasparon en RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma); PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo; 100 μ M) y fosfatasa (vanadato sódico 1 mM). Las muestras se depositaron en hielo durante 5 minutos, calentándose a continuación a 100°C durante 5 minutos.

14. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA TIPO WESTERN

14.1 SDS-PAGE

Los extractos celulares se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE: electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS) para poder estudiar su composición proteica. Para ello se cargaron de 10-100 μ g de proteínas sobre los geles.

Los geles presentaron dos porciones, la de resolución, situada en la parte inferior del gel, y la de apilado, en la parte superior. La zona de resolución se realizó con tampón

Tris-HCl (1.5 M pH 8.8), acrilamida:bisacrilamida 29:1 al 8,10,12 o 15%, en función del rango de separación de pesos moleculares deseado, SDS (10%), PSA (persulfato amónico; 10%) y TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina; 0.08%). La zona de apilado presentó un porcentaje constante del 3% con independencia del % utilizado en la zona de resolución (Tris-HCl 1M pH 6.8; acrilamida:bisacrilamida 29:1 3%; SDS 10%; PSA 10%; TEMED 0.1%).

Para identificar los pesos moleculares de las proteínas se utilizó un marcador de peso molecular (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific).

La electroforesis se realizó en presencia del tampón de electroforesis (Tris 25 mM; SDS 0.1% (p/v); glicina 0.2 M; pH 8.3). Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond, GE Healthcare Life Sciences) en presencia del tampón de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% (v/v); pH 8.3).

Las membranas se bloquearon con leche al 5% (p/v) en TTBS (Tris 20 mM; NaCl 150 mM; Tween-20 0.1% (v/v); pH 7.5) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (**Tabla 5**) se incubó en BSA al 2% (p/v) en TTBS durante la noche a 4°C. El anticuerpo secundario (**Tabla 5**), se incubó en leche al 2% (p/v) en TTBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas se revelaron mediante quimioluminiscencia (ECL, Advansta) gracias a la conjugación de los anticuerpos secundarios a la peroxidasa de rábano, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las membranas se expusieron a películas de autorradiografía (*Fuji Medical X-Ray Film*, Fujifilm), que se escanearon. Se realizaron triplicados biológicamente independientes, mostrándose una imagen representativa junto a la cuantificación de las réplicas, que se realizó empleando el software ImageJ.

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados

En la Tabla queda recogida la relación de anticuerpos primarios y secundarios empleada en la inmunodetección. UQCRC2 (ubiquinol citocromo *c* reductasa, proteína nuclear 2).

| Anticuerpos primarios | | | | |
|-------------------------|---------|----------|------------|------------------|
| Anticuerpo | Especie | Dilución | Referencia | Casa Comercial |
| NDUFV1 | Conejo | 1/500 | AV48312 | Sigma |
| NDUFS1 | Cabra | 1/500 | sc-50132 | Santa Cruz |
| NDUFB8 | Ratón | 1/1000 | ab110242 | Abcam |
| UQCRC2 | Ratón | 1/500 | A-11143 | Molecular Probes |
| p22 ^{phox} | Conejo | 1/500 | sc-20781 | Santa Cruz |
| NRF2 | Cabra | 1/500 | sc-30915 | Santa Cruz |
| HIF1 α | Conejo | 1/200 | ab65979 | Abcam |
| β -actina | Ratón | 1/30000 | A5441 | Sigma |
| Anticuerpos secundarios | | | | |
| Anticuerpo | Especie | Dilución | Referencia | Casa Comercial |
| Anti-Ratón | Cabra | 1/4000 | A4416 | Sigma |
| Anti-Conejo | Ratón | 1/5000 | A1949 | Sigma |
| Anti-Ratón | Cabra | 1/10000 | 170-6516 | BioRad |
| Anti-Cabra | Conejo | 1/10000 | ab6741-1 | Abcam |
| Anti-Conejo | Cabra | 1/10000 | sc-2030 | Santa Cruz |

14.2 BNGE

Las mitocondrias extraídas y solubilizadas con digitonina, se separaron electroforéticamente en geles nativos (BNGE: *Blue Native Gel Electrophoresis*), con la finalidad de poder evaluar el ensamblaje de la cadena transportadora mitocondrial.

Se utilizaron geles nativos del 3-12% de acrilamida (NativePAGE Novex 3-12% Bis-Tris *Protein Gels*, Life Technologies). La cantidad de mitocondria cargada en los geles fue siempre la máxima (10-50 μg de proteína mitocondrial solubilizada), en presencia de 1/10 de tampón de carga (Serva-Blue G 5%; ácido 6-aminohexanoico 1M). La electroforesis se realizó a 40 V durante toda la noche, empleando soluciones diferentes para las cámaras de ánodo y del cátodo (ánodo: Bis-Tris 50 mM pH 7; cátodo: tricina 50 mM; Bis-Tris/HCl 15 mM; pH 7) ¹³⁷.

14.3 2D SDS-PAGE

Tras la separación de las proteínas en condiciones nativas, una segunda dimensión (2D) en condiciones desnaturalizantes se realizó para algunos de los complejos identificados, con la finalidad de evaluar su composición.

Para ello, los geles se denaturalizaron en presencia de 1% SDS y 1% de β -mercaptoetanol durante 1 hora. Las fracciones deseadas, visualizadas con posterioridad a la realización del ensayo de actividad del complejo I en gel, se recortaron y depositaron sobre geles desnaturalizantes (SDS-PAGE). La fracción del gel de apilamiento se polimerizó sobre los fragmentos. A continuación se realizó la electroforesis y transferencia tipo Western con posterior inmunodetección proteica, tal y como ha sido descrito en el apartado anterior (14.1).

14.4 Transferencia directa BNGE

La transferencia directa a membranas de nitrocelulosa de geles BNGE se realizó con la finalidad de confirmar la organización de los complejos mitocondriales. Para ello, los geles se incubaron durante 20 minutos en agitación, a 4°C, en presencia de tampón de transferencia carbonatado (10 mM NaHCO_3 ; 3 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; pH 9.5-10). La transferencia se realizó a 300 mA y 60 V durante 1 hora, continuándose la inmunodetección tal y como ha sido descrita en el apartado 14.1.

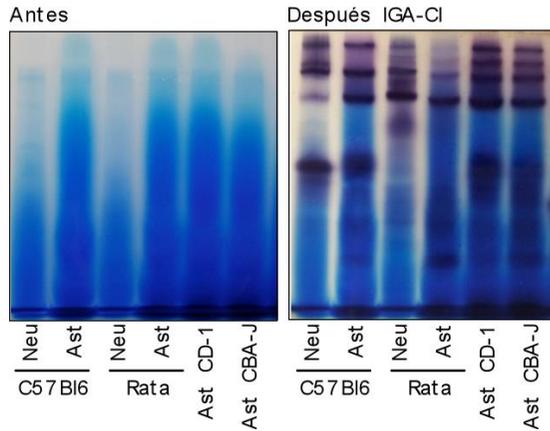
15. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I EN GEL

Posterior a la separación electroforética de las mitocondrias en los geles nativos, se determinó la actividad del complejo I en los geles (IGA-CI). Para ello, una vez finalizada la electroforesis, los geles se lavaron en tampón de electroforesis para eliminar los restos de tampón de carga que hubieran podido quedar remanentes en el gel. A continuación, los geles se incubaron en solución de actividad (en fresco) (Tris-HCl 0.1M pH 7.4; NTBZ (nitroazul de tetrazolio) 1 mg/ml; NADH 0.14 mM) a temperatura ambiente

de 30-60 minutos¹³⁷. La reacción se detuvo lavando el gel en agua destilada. La aparición de precipitados azul-morados resultó indicativa de la presencia de actividades NADH oxidasas, como el complejo I mitocondrial, lo que nos permitió analizar la localización de este complejo en nuestras preparaciones, sumado a la posterior confirmación mediante transferencia tipo Western. La siguiente figura (**Figura 11**) ilustra un ejemplo de este ensayo de actividad.

Figura 11. Ensayo de actividad del complejo I en gel

Imágenes que muestran la aparición de precipitados azul-morados en las regiones con actividad NADH oxidasa tras el ensayo IGA-CI. (Neu: neuronas; Ast: astrocitos)



16. ELECTROELUCIÓN DE PROTEINAS

Una vez separadas las proteínas en geles BNGE y detectadas las actividades del complejo I mediante IGA-CI, las bandas identificadas se recortaron y se sometieron a electroelución para liberar a las proteínas.

Para ello, los fragmentos recortados se depositaron en membranas de electrodiálisis (*Dialysis Tubing-Visking*, Mediall International). Se aplicó un campo eléctrico durante 4 horas a 100 V en presencia del tampón del ánodo (véase composición en 14.2). El volumen del electroeluido se recolectó y se evaluó la actividad del complejo I (véase 10.1).

17. ANÁLISIS PROTEICO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las bandas correspondientes al complejo I, y los supercomplejos del complejo I, identificadas en geles BNGE tras la IGA-CI, junto con las regiones interbandas, fueron recortadas y tripsinizadas utilizando los protocolos estándar de digestión en gel.

Los péptidos digeridos se extrajeron mediante dos alícuotas sucesivas de 15 μ l de 60% de acetonitrilo y 4% de ácido fórmico, que posteriormente se juntaron. Una porción de 15 μ l del extracto se secó por completo empleando el Speed-Vac, y se resuspendió en 0.1% de ácido fórmico.

Las muestras se procesaron en el espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher) tras su separación cromatográfica, en una columna de nanoescala en fase reversa (75 µm de diámetro interno, 100 mm de longitud de separación), en un gradiente del 0-40% de solución B (acetonitrilo 95%; ácido fórmico 0.1%) en solución A (acetonitrilo 5%; ácido fórmico 0.1%) durante 84 minutos a 300 nL/min. La cromatografía se realizó en el equipo Proxeon Easy-nLC.

El espectrómetro se programó para realizar un ciclo de trabajo empezando por un análisis de masas de baja resolución (en el Linear Ion Trap), seguido por un set de dos análisis. El primero, un escaneado de masas de alta resolución (Orbitrap), y el segundo, un aislamiento de péptidos y eventos de fragmentación en la celda de colisión del espectrómetro, de como máximo, los 10 péptidos más intensos eluidos de la cromatografía. A los péptidos individuales se les permitió un máximo de dos fragmentaciones sucesivas y análisis, antes de ser excluidos de posteriores análisis.

La asignación de la secuencia de los péptidos al espectro de fragmentación, y posterior identificación de proteínas, se realizó con el software Proteome Discoverer (Thermo Scientific) configurado para enviar el espectro al programa de identificación de proteínas Mascot (Matrix Science).

El programa Mascot se configuró para usar el conjunto de proteínas de *Mus musculus* de la base de datos de Uniprot (diciembre 2013). Los parámetros de búsqueda empleados fueron: especificidad enzimática para tripsina, posibilidad de presencia de metioninas modificadas (por oxidación) y residuos de cisteína modificados (como consecuencia de la adición de monómeros no polimerizados de los geles de acrilamida).

Una vez se realizó la asignación de los péptidos del espectro, se cuantificó la intensidad relativa de los péptidos utilizando el programa Proteome Discoverer, con los componentes de detección de eventos, y la detección de las áreas de los péptidos precursores. La cuantificación permitió estimar la intensidad relativa de las proteínas, al agrupar los péptidos derivados de la misma proteína, seleccionando, cuando es posible, los tres péptidos más intensos, y promediando sus intensidades relativas. Cuando se dispone de menos de tres péptidos, se utilizan los péptidos disponibles para dar el valor medio. Con esta aproximación, es posible comparar la intensidad de proteínas particulares a lo largo de los diferentes fragmentos del gel, reduciendo en gran medida el problema de la diferente ionización de los péptidos.

A partir de los análisis realizados en las diferentes posiciones del gel, se realizó una normalización de las intensidades por el valor máximo, de esta forma es posible conocer la zona del gel en la que se acumula la proteína de interés. Este abordaje permite agrupar a las proteínas en función de su localización a lo largo del gel. Esta aproximación experimental es conocida como el análisis complexómico ¹⁰³.

El estudio de espectrometría de masas fue realizado por el servicio de espectrometría de masas de la *Mitochondrial Biology Unit*, del *Medical Research Council*, Cambridge, en colaboración con el Dr. Michael P. Murphy.

Se realizaron diferentes réplicas biológicas (n=4), para neuronas y astrocitos, de manera que se seleccionaron aquellas proteínas presentes en todas las réplicas en los dos tipos celulares, promediándose los valores normalizados de intensidad a lo largo de las diferentes posiciones del gel, con la finalidad de determinar la abundancia relativa de las diferentes proteínas entre neuronas y astrocitos a lo largo del gel.

La intensidad promedio de las subunidades del complejo I se normalizó por la intensidad promedio acumulada en las regiones de los supercomplejos (I+III₂ y I₂+III₂), para neuronas y astrocitos.

18. PURIFICACIÓN DE RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo mediante el estuche comercial *GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit* (Sigma), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Básicamente, las células se homogenizaron en un tampón que contiene tiocianato de guanidina para asegurar la completa desnaturalización de macromoléculas e inactivación de RNAsas. Posteriormente se adiciona etanol para que el RNA se una a la membrana de sílice cuando el lisado se hace pasar por la columna.

Una vez eluido el RNA se cuantificó mediante espectrofotometría empleando el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El ratio de absorbancia 260/280 nm se utilizó para determinar la pureza del RNA extraído, empleándose aquellos RNA situados en el rango 1.8-2.

19. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA TIEMPO REAL

La RT-qPCR fue el método de elección para evaluar la expresión relativa de genes. Como control interno, se estudió la expresión de *β-actina*. Este método establece comparaciones entre genes diana respecto a un gen control (*β-actina*), de expresión constante en las muestras a estudiar, al mismo tiempo que relativiza esta expresión a una condición control.

Se optimizó la concentración de los cebadores para la RT-qPCR, asimismo la temperatura de la reacción, calculándose para cada pareja de cebadores su eficiencia. Se consideraron buenas condiciones aquellas que resultan en eficiencias del 90-110%^{138,139}. Para ello, diluciones seriadas del RNA se valoraron en conjunción a diferentes concentraciones de cebadores y temperaturas. De esta forma es posible establecer comparaciones entre los diferentes genes estudiados. En la **Tabla 6** se encuentran las condiciones y secuencias de los cebadores empleados, tras su optimización, para los diferentes RNAs mensajeros (mRNA).

Tabla 6. Cebadores y condiciones de amplificación empleadas en RT-qPCR

| mRNA | Directo (5'-3') | Reverso (5'-3') | Concentración | Temperatura |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|-------------|
| <i>Nox1</i> | CTGTAGGCGCCCTAAGTTTG | AAACCGGAGGATCCTTTTCAC | 0.1 μ M | 58 °C |
| <i>Nox2</i> | ATGCAGGAAAGGAACAATGC | GTGCACAGCAAAGTGATTGG | 0.1 μ M | 58 °C |
| <i>Nox3</i> | ACAAATGCAGTGAGGCACAG | CCGTGTTTCCAGGGAGAGTA | 0.1 μ M | 58 °C |
| <i>Nox4</i> | TGCAGAGATATCCAGTCTTCC | TCCCATCTGTTTGACTGAGG | 0.1 μ M | 58 °C |
| <i>Duox1</i> | CTGACCCACCACCTCTACATC | CAGGAAGAAGATGTGAAACG | 0.1 μ M | 58 °C |
| <i>Duox2</i> | TGAGAAATGGCTTCTCTCCA | TCCGGAAACATAGACTCCAC | 0.1 μ M | 58 °C |
| <i>p22^{phox}</i> | CTGGCCTGATTCTCATCACT | GGGATACTCCAGCAGACAGA | 0.1 μ M | 58 °C |
| <i>GCLc</i> | GGCACAAGGACGTGCTCAAGT | TTTGTCTCTCCCCCTTCTC | 0.3 μ M | 50 °C |
| <i>HO-1</i> | AGCACAGGGTGACAGAAGAG | GAGGGACTCTGGTCTTTGTG | 0.4 μ M | 50 °C |
| <i>β-actina</i> | AGAGTCATGAGCTGCCTGAC | CAACGTCACACTTCATGATG | 0.4 μ M | 58 °C |

Para la realización de la RT-qPCR se utilizó el estuche comercial *Power SYBR Green RNA-to-C_t 1-Step Kit* (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificaron 100 ng de RNA, realizándose la amplificación en un volumen final de 20 μ l. Las reacciones se realizaron por triplicado empleando el termociclador *Mastercycler ep Realplex* (Eppendorf).

Tras la amplificación, se obtuvieron los valores de C_q (ciclo umbral) para cada reacción, calculándose los rangos de expresión de acuerdo al método comparativo de C_q^{138,139}. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias de expresión (*fold*) entre la muestra problema y la control. De esta forma, niveles de expresión iguales a 1 indican no variación entre las condiciones utilizadas. Cuando se obtuvieron valores superiores a 1 asumimos mayores niveles de expresión en la muestra problema respecto a la control; valores inferiores a 1 nos indican una disminución en la expresión del gen de interés en nuestra condición problema respecto a la control.

20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las determinaciones se realizaron, al menos, en dos réplicas biológicas (cultivos o animales). Los valores están expresados como la media \pm SEM (error estándar de la media). Las comparaciones entre dos grupos de valores se realizaron mediante el test de la *t* de Student's. En los casos en lo que comparaciones múltiples fueron necesarias se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Bonferroni. El análisis estadístico se realizó usando el programa SPSS. En todos los casos, $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo, representándose mediante *.

4. RESULTADOS



1. LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO ES MAYOR EN ASTROCITOS QUE EN NEURONAS Y PRESENTA UN ORIGEN MITOCONDRIAL

Con la finalidad de estudiar la producción de ROS en cerebro, se realizaron diversos abordajes, basados en el uso de cultivos primarios (*in vitro*) y diversas aproximaciones *ex vivo*. Para determinar la generalidad del proceso en diferentes especies se realizaron cultivos primarios de neuronas y astrocitos de ratones C57Bl6 y ratas Wistar.

1.1 *In vitro*

Dadas las limitaciones asociadas a las diferentes herramientas de detección de ROS, se emplearon varios métodos.

1.1.1 Medida de la producción de H₂O₂ en célula entera

La producción de H₂O₂ se valoró mediante el reactivo AmplexRed en cultivos primarios de neuronas y astrocitos. Como puede observarse en la **Figura 12 (a)**, los astrocitos producen en torno ~10 veces más H₂O₂ que las neuronas, en ambas especies estudiadas. Dado que los cultivos de neuronas y astrocitos se realizan en diferentes medios de cultivo, se quiso valorar la influencia del medio sobre la producción de H₂O₂. Para ello, 24 horas antes de la determinación, el medio se reemplazó por el medio de cultivo neuronal (Neurobasal-AO, con antioxidantes). En esta condición (**Figura 12b**), los astrocitos continuaron siendo más productores de H₂O₂ que las neuronas.

El medio Neurobasal se encuentra suplementado con B27, rico en antioxidantes, razón por la cual valoramos la producción de H₂O₂ en Neurobasal con B27 sin antioxidantes (MAO), por si estos estuvieran favoreciendo la eliminación de las ROS, y por tanto, afectando a los valores observados. En estas circunstancias (**Figura 12c**), los astrocitos de ambas especies produjeron más H₂O₂ que las neuronas.

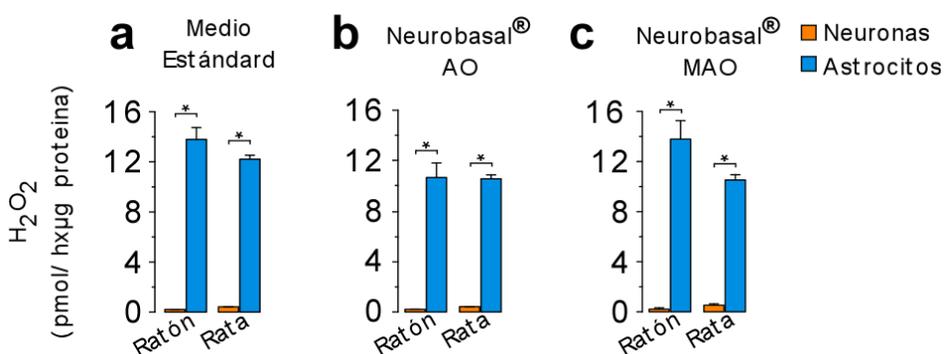


Figura 12. La producción de H₂O₂ es mayor en astrocitos que neuronas

La producción de H₂O₂ (pmol/h·µg proteína) se determinó a partir de cultivos primarios de neuronas (d7) y astrocitos (d14) de ratas Wistar y ratones C57Bl6. La determinación se realizó en **(a)** medio estándar, DMEM+10%SF para astrocitos, y Neurobasal-AO para neuronas. 24 horas previas a la determinación el medio se reemplazó por **(b)** Neurobasal con AO o **(c)** MAO. (Se muestra un experimento representativo con 8 réplicas experimentales) * $p < 0.05$ (*t* de Student 's)

A la vista de estos resultados, podemos concluir que los astrocitos, con independencia de su especie y de las condiciones de cultivo, producen más H_2O_2 que las neuronas.

1.1.2 Medida de la producción de H_2O_2 en mitocondrias aisladas

La mitocondria constituye uno de los principales sitios de producción de ROS a nivel celular. Es por ello por lo que se aislaron mitocondrias a partir de cultivos primarios, mediante el protocolo de gradiente de Percoll, y se determinó la producción de H_2O_2 . En las mitocondrias aisladas se observó (**Figura 13**) mayor producción en los astrocitos, tanto de ratón C57Bl6 como rata Wistar.

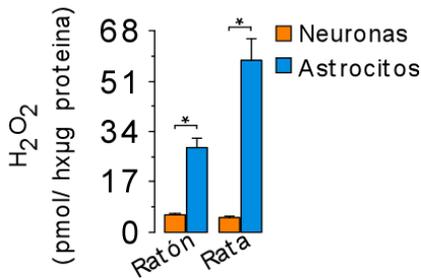


Figura 13. Las mitocondrias astrocíticas producen más H_2O_2 que las neuronales

La producción de H_2O_2 (pmol/h·µg proteína) se evaluó mediante el reactivo AmplexRed en mitocondrias aisladas a partir de cultivos primarios de neuronas y astrocitos. * $p < 0.05$ (*t* de Student's) (n=4)

Mediante esta determinación pudo observarse el origen mitocondrial de las especies reactivas de oxígeno, puesto que las diferencias detectadas entre neuronas y astrocitos en células en cultivo (**Figura 12**) se mantenían al purificar la mitocondria.

1.1.3 Medida de $O_2^{\cdot-}$

Dados los altos niveles de producción de H_2O_2 detectados en los cultivos de astrocitos, quisimos valorar como se encontraba en nuestras células el $O_2^{\cdot-}$, puesto que el H_2O_2 principalmente se produce a nivel celular gracias a la reducción del $O_2^{\cdot-}$ por acción de la SOD. Es por ello, por lo que se valoró la producción de $O_2^{\cdot-}$ en los cultivos de neuronas y astrocitos mediante la sonda MitoSox. Se trata de una sonda derivada del bromuro de etidio, que penetra en la mitocondria en función del $\Delta\Psi_m$, intercalándose en el DNA mitocondrial y emitiendo fluorescencia de manera proporcional al $O_2^{\cdot-}$ presente. Esta determinación nos informa por tanto, del $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial.

Dada la capacidad de la sonda para intercalarse en el DNA, evaluamos su localización. Para ello, las células fueron marcadas con la sonda MitoSox y una sonda que colorea a las mitocondrias de manera específica (Cytosinker Mitochondrial Staining Kit Green, Abcam). En la **Figura 14** observamos la localización mitocondrial de la sonda MitoSox, tanto en neuronas como en astrocitos.

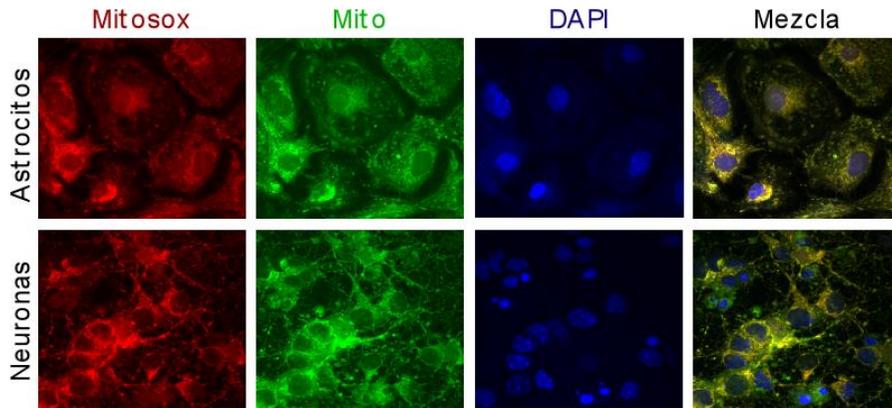


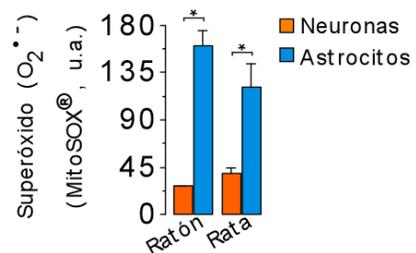
Figura 14. La sonda Mitosox se localiza en la mitocondria

Los cultivos de neuronas y astrocitos se incubaron con la sonda Mitosox, y una sonda específica para las mitocondrias (Mito). Los núcleos se marcaron con DAPI. Observamos la localización mitocondrial del Mitosox, tanto en neuronas como en astrocitos.

Así pues, valoramos la producción de $O_2^{\cdot -}$ (mitocondrial) en cultivos primarios de neuronas y astrocitos mediante la sonda Mitosox. En la **Figura 15** puede observarse como los astrocitos Wistar presentan ~ 3 veces más $O_2^{\cdot -}$ que las neuronas. Para los ratones C57Bl6 se observó un incremento en los niveles de $O_2^{\cdot -}$ de ~ 6 veces en los astrocitos respecto a las neuronas.

Figura 15. Los niveles de $O_2^{\cdot -}$ son mayores en astrocitos que neuronas

Determinación de los niveles de $O_2^{\cdot -}$ mediante la sonda Mitosox (u.a.) en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de rata Wistar y ratón C57Bl6. * $p < 0.05$ (t de Student's) ($n=3$)



Por tanto, los astrocitos, tanto de ratas Wistar como ratones C57Bl6, presentan mayores niveles de $O_2^{\cdot -}$ en la mitocondria que las neuronas.

1.2 Ex vivo

1.2.1 Determinación de $O_2^{\cdot -}$ en células Integrina-B5⁺

Con la finalidad de valorar las diferencias observadas *in vivo* realizamos una aproximación basada en la disgregación e individualización de células cerebrales, y el marcaje mediante anticuerpos de superficie, en ratones C57Bl6. La utilización de proteínas de superficie permite estudiar parámetros celulares a partir de células intactas, tales como

los niveles de superóxido y/o el potencial de membrana. Seleccionamos la proteína de superficie celular Integrina-β5, específica para astrocitos ¹⁴⁰.

En las células individualizadas y marcadas con Integrina-β5 (positivas o negativas) se analizó el $O_2^{\cdot-}$ y el $\Delta\Psi_m$ mediante citometría de flujo. Observamos como tanto los niveles de $O_2^{\cdot-}$ (**Figura 16a**) como el $\Delta\Psi_m$ (**Figura 16b**), era mayor en las células Integrina-β5⁺, correspondientes a los astrocitos.

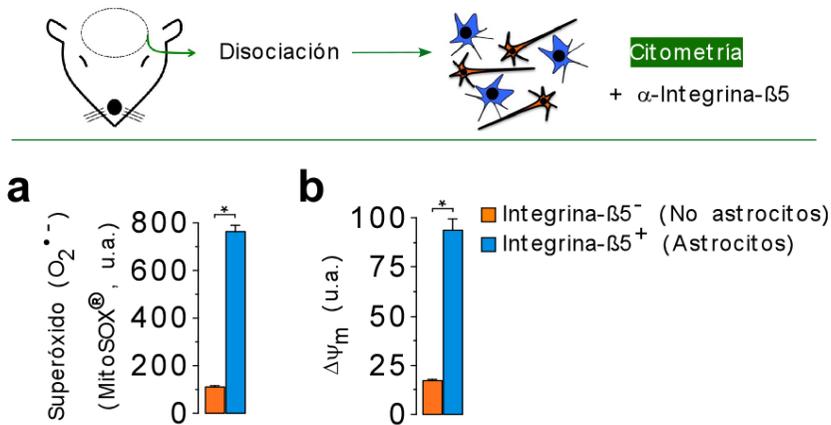


Figura 16. Los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y $\Delta\Psi_m$ son mayores en la población de células Integrina β5⁺
 En la figura se muestra un esquema del proceso. **(a)** Niveles de $O_2^{\cdot-}$ analizados mediante la sonda MitoSOX (u.a.) en células Integrina-β5^{+/-} **(b)** Determinación del $\Delta\Psi_m$ (u.a.) en células Integrina-β5^{+/-}.
 * $p < 0.05$ (*t* de Student's) (n=3)

Mediante esta aproximación *ex vivo* hemos podido corroborar las diferencias observadas en los niveles de ROS en cultivos primarios, siendo los astrocitos más productores que las células no astrocíticas, entre las que se encuentran las neuronas.

1.2.2 Determinación de $O_2^{\cdot-}$ en células GFP⁺

Para determinar la producción en neuronas y astrocitos *in vivo* de manera más específica, se realizaron inyecciones estereotáxicas de AAV que promueve la expresión de GFP bajo un promotor neuronal (PGK) o astrocítico (ABCD1). Los AAV fueron inyectados en ratones C57Bl6, en diferentes hemisferios.

Corroboramos la especificidad del marcaje GFP mediante inmunohistoquímica con anticuerpos neuronales (NeuN, proteína neuronal nuclear) o astrocíticos (GFAP) (**Figura 17**), observando la expresión GFP dependiente de los AAV.

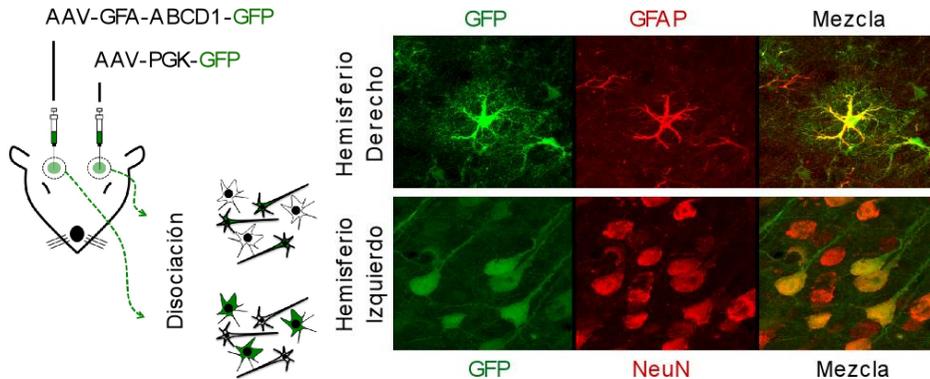


Figura 17. La expresión de AAV es específica para el tipo celular deseado

Para cada hemisferio cerebral se realizó el marcaje anti-neuronal (NeuN) y anti-astrocítico (GFAP) mediante inmunohistoquímica, observándose colocalización con GFP de manera dependiente del AAV inyectado.

Los niveles de $O_2^{\cdot-}$ se determinaron mediante la sonda Mitosox, a partir de disgregados tisulares de cada hemisferio, en las células GFP⁺ (astrocitos o neuronas), observándose mayor producción en las células correspondientes a astrocitos (**Figura 18**).

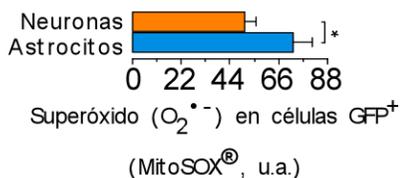


Figura 18. Los astrocitos *ex vivo* presentan mayores niveles de $O_2^{\cdot-}$

Los niveles de $O_2^{\cdot-}$ se analizaron a partir de disgregados tisulares de los hemisferios cerebrales en las células GFP⁺, correspondientes a neuronas o astrocitos, mediante la sonda Mitosox (u.a.). * $p < 0.05$ (*t* de Student's) (n=8)

Con estos resultados, pudimos observar como los astrocitos producen más especies reactivas de oxígeno que las neuronas, tanto en cultivos primarios de ratones C57Bl6 y ratas Wistar, como *ex vivo*. Además, gracias a la determinación de H_2O_2 a partir de mitocondrias aisladas, y el empleo de la sonda Mitosox, específica para el $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial, pudo observarse como el origen de las diferencias en la producción de ROS entre neuronas y astrocitos era debido a la mitocondria.

Estos resultados contrastan con la visión generalizada acerca del papel antioxidante de los astrocitos, como consecuencia de la mayor acumulación de antioxidantes, su menor susceptibilidad al estrés oxidativo, y su contribución al mantenimiento de las defensas antioxidantes en neuronas^{129,130,132}.

2. LAS DIFERENCIAS EN LA PRODUCCIÓN DE ROS ENTRE NEURONAS Y ASTROCITOS NO SON DEBIDAS A LAS NOX O XO, SIENDO EL COMPLEJO I MITOCONDRIAL UN PLAUSIBLE CANDIDATO

2.1 Papel de las NOX y XO en la producción de ROS

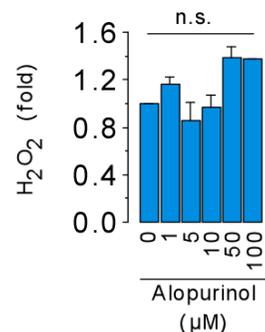
Dados los elevados niveles de ROS observados en astrocitos, y a pesar de que la producción de ROS por la mitocondria responde a las diferencias observadas, quisimos valorar la contribución de fuentes no mitocondriales de ROS, tales como la XO y las NOX, en astrocitos C57Bl6.

2.1.1 Contribución de la XO

Para descartar la contribución de la XO en la producción de ROS de astrocitos durante la determinación de la velocidad de producción de H_2O_2 , las células se incubaron con diferentes concentraciones de alopurinol, un inhibidor específico de la XO. En la **Figura 19** se observa como el alopurinol no afectó a la producción de H_2O_2 en astrocitos, lo que implica que la actividad ROSgénica de la XO no contribuye a los altos niveles de ROS observados en astrocitos.

Figura 19. La inhibición de la XO no reduce la producción de H_2O_2 en astrocitos

La producción de H_2O_2 se determinó en presencia de diferentes dosis de alopurinol (1, 5, 10, 50 y 100 μ M) en cultivos primarios de astrocitos. La producción se encuentra normalizada (*fold*) respecto a la condición control (0 μ M). n.s. (no significativo) $p > 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=2)



2.1.2 Contribución de las NOX

Dada la generación de ROS descrita por las NOX, quisimos evaluar su expresión en neuronas y astrocitos de ratones C57Bl6. Para ello, realizamos ensayos RT-qPCR para las distintas NADPH oxidasas (NOX1-4 y Duox1-2) en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de ratón C57Bl6. Los niveles de expresión de la isoforma NOX5 no se determinaron dado que esta isoforma no se expresa en roedores, a diferencia de lo que ocurre en humanos ¹⁴¹. La expresión de las distintas isoformas en astrocitos se encuentra referenciada frente a neuronas, tras normalizarse frente a la expresión del mRNA control β -actina. En la **Figura 20** puede observarse como los astrocitos tienen una elevada expresión de *NOX1*, *2* y *4*, y no expresan *Duox1-2*. Las neuronas por el contrario expresan más *NOX3*, *Duox1-2* que los astrocitos.

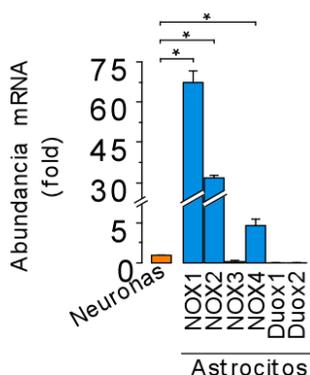


Figura 20. Astrocitos y neuronas difieren en la expresión de las diferentes isoformas de las NOX

La expresión de las isoformas *NOX1-4* y *Duox1-2* se valoró en cultivos primarios de neuronas y astrocitos C57Bl6 mediante RT-qPCR. La expresión de las isoformas se encuentra referenciada a la expresión del mRNA β -actina, habiéndose normalizado la expresión en astrocitos frente a la observada en neuronas (*fold*). * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) ($n=3$)

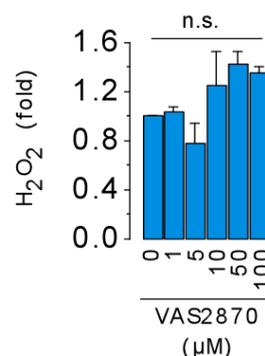
La mayor abundancia de NOX en los astrocitos podría estar contribuyendo a los altos niveles de ROS observados en astrocitos. Es por ello por lo que se descartó la contribución de estas enzimas mediante el empleo de dos abordajes experimentales:

2.1.2.1 Efecto del inhibidor VAS2870

La contribución de las NOX a la producción de H_2O_2 se evaluó mediante el tratamiento con el inhibidor específico de las NOX VAS2870. En estas condiciones, no se observó una disminución en la producción de H_2O_2 a ninguna dosis estudiada en cultivos primarios de astrocitos C57Bl6 (**Figura 21**), evidenciando la no contribución de las NOX sobre los niveles de ROS observados en astrocitos.

Figura 21. La inhibición de las NOX no disminuye la producción de H_2O_2 en astrocitos

La producción de H_2O_2 se determinó en presencia de diferentes concentraciones de VAS2870 (1, 5, 10, 50 y 100 μ M) en cultivos primarios de astrocitos. La producción se encuentra normalizada (*fold*) respecto a la condición control (0 μ M). n.s. $p > 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) ($n=2$)



2.1.2.2 Silenciamiento p22^{phox}

Para conocer el papel de las NOX en la producción de ROS en astrocitos (C57Bl6), se silenció la subunidad p22^{phox} ¹⁶, esencial para el ensamblaje de NOX1, 2 y 4, isoformas principales en astrocitos (**Figura 20**). El silenciamiento de p22^{phox} se corroboró mediante RT-qPCR (**Figura 22a**) y transferencia tipo Western (**Figura 22b**), donde pudo observarse tanto la disminución del mRNA como de la proteína. En estas condiciones, la

producción de H_2O_2 (**Figura 22c**) no mostró variaciones al referenciarla a la condición control (siControl).

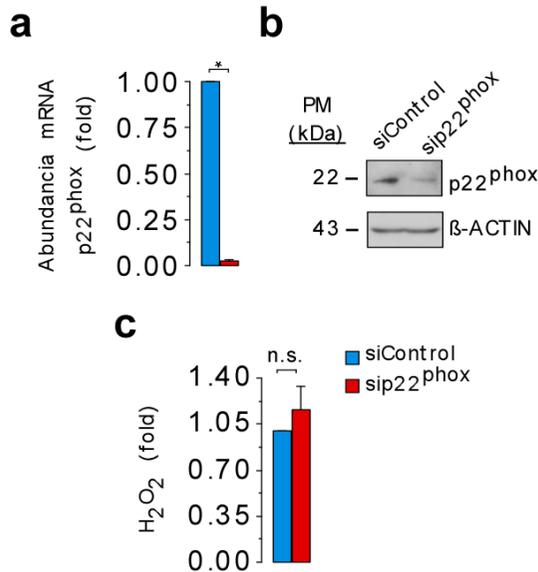


Figura 22. El silenciamiento de p22^{phox} no afectó a la producción de H₂O₂ en astrocitos

El silenciamiento de p22^{phox} se valoró mediante **(a)** RT-qPCR, normalizándose la expresión frente al mRNA control β -actina y a la condición control (siControl) * $p < 0.05$ (t de Student's) (n=2) **(b)** y transferencia tipo Western. **(c)** Medida de H₂O₂ tras el silenciamiento de la subunidad p22^{phox}. La producción se encuentra normalizada (fold) frente a la condición control (siControl). (PM peso molecular) n.s. $p > 0.05$ (t de Student's) (n=2)

Por tanto, podemos descartar la actividad ROSgénica de la XO y las NOXs sobre los altos niveles de ROS observados en astrocitos.

2.2 Efecto de los inhibidores de la cadena transportadora sobre las ROS

Para estimular la producción de $O_2^{\cdot -}$ por la cadena transportadora mitocondrial, los cultivos primarios de neuronas y astrocitos C57Bl6 se trataron con antimicina A (15 minutos, 10 μ M), un inhibidor del complejo III que incrementa la producción de $O_2^{\cdot -}$. En estas condiciones (**Figura 23**), tanto las neuronas como los astrocitos, incrementaron su producción, siendo los astrocitos los más productores.

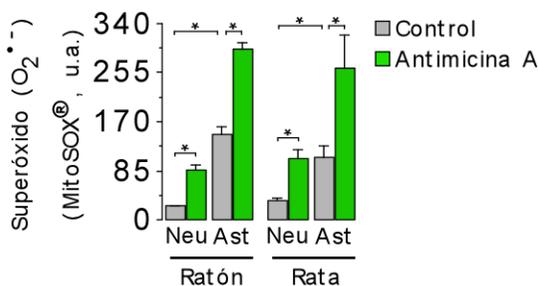


Figura 23. La antimicina A incrementa los niveles de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial

En la gráfica podemos observar los niveles de $O_2^{\bullet-}$ determinados mediante la sonda MitoSOX (u.a.) en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de ratón C57Bl6 y rata Wistar. En las barras grises observamos la producción en condiciones control, y en verde tras la estimulación con antimicina A 10 μ M durante 15 minutos. * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=3)

Dada la localización de la sonda MitoSOX en la mitocondria de manera dependiente del $\Delta\Psi_m$, evaluamos el $\Delta\Psi_m$ en nuestros cultivos. Observamos como el $\Delta\Psi_m$ es mayor en astrocitos que en neuronas (**Figura 24**), tal y como ya habíamos observado mediante el análisis del $\Delta\Psi_m$ en células Integrina- $\beta 5^+$ (**Figura 16b**). Esto podría suponer que las diferencias observadas en la determinación de $O_2^{\bullet-}$ podrían ser debidas al potencial. Para descartar esta posibilidad, determinamos el $\Delta\Psi_m$ en presencia de antimicina A. En estas condiciones (**Figura 24**), la antimicina A disminuyó el $\Delta\Psi_m$, tanto en neuronas como en astrocitos, a pesar de incrementar la producción de $O_2^{\bullet-}$ (**Figura 23**). Por tanto, esta determinación evidencia, de manera indirecta, como la producción de $O_2^{\bullet-}$ en los astrocitos no es una consecuencia directa del $\Delta\Psi_m$, puesto que con antimicina A es posible reducir el $\Delta\Psi_m$, e incrementar los niveles de $O_2^{\bullet-}$.

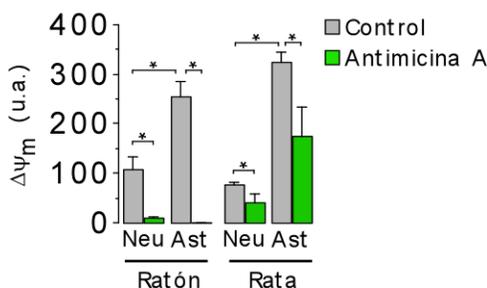


Figura 24. El $\Delta\Psi_m$ disminuye en presencia de antimicina A

El $\Delta\Psi_m$ (u.a.) se determinó en cultivos primarios de neuronas y astrocitos (Wistar y C57Bl6), en ausencia y en presencia de antimicina A (10 μ M, 15 minutos). * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=3)

De igual forma, los niveles de $O_2^{\bullet-}$ y el $\Delta\Psi_m$ se determinaron en cultivos primarios de ratones C57Bl6, en presencia de rotenona (10 μ M, 15 minutos), un inhibidor del complejo I. Se observó un incremento en los niveles de $O_2^{\bullet-}$ (**Figura 25a**) tras la inhibición del complejo I con rotenona, tanto en astrocitos como en neuronas. La incubación de las células con rotenona disminuyó el $\Delta\Psi_m$ (**Figura 25b**) a pesar del incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ (**Figura 25a**). Este efecto de la rotenona sobre el

$\Delta\Psi_m$ confirma la ausencia de un efecto directo del $\Delta\Psi_m$ sobre la determinación de $O_2^{\cdot-}$ mediante Mitosox, ya observado con el uso de antimicina A (**Figura 24**).

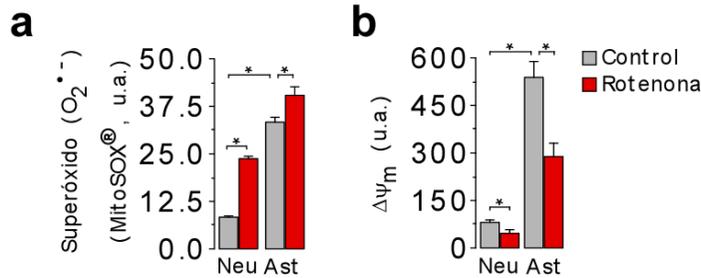


Figura 25. La rotenona incrementa los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y disminuye el $\Delta\Psi_m$

Determinación de los niveles de (a) $O_2^{\cdot-}$ (Mitosox, u.a.), (b) $\Delta\Psi_m$ (u.a.), en presencia y ausencia de rotenona (10 μ M, 15 minutos) en cultivos primarios de neuronas y astrocitos C57Bl6. * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=3)

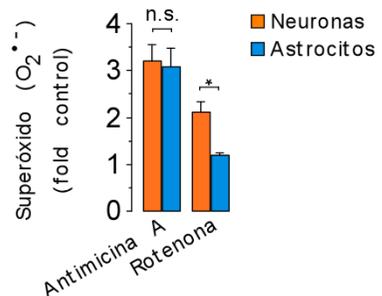
Los experimentos con los inhibidores de la cadena transportadora han demostrado:

(i) como el potencial de membrana no es el responsable de las diferencias en la determinación de $O_2^{\cdot-}$ mediante la sonda Mitosox. Los astrocitos presentan mayor $\Delta\Psi_m$ que las neuronas y mayores niveles de $O_2^{\cdot-}$, no como consecuencia de una mayor permeabilidad de la sonda hacia la mitocondria, sino por su diferente capacidad productora.

(ii) su capacidad de incrementar la producción de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial tanto en neuronas como astrocitos. No obstante, la rotenona presentó un efecto diferencial sobre la estimulación de la producción de ROS en neuronas y astrocitos, tal y como podemos observar en la **Figura 26**. En el caso de la antimicina A, astrocitos y neuronas incrementaron su producción de forma similar (~ 3 veces). No obstante, la rotenona incrementó la producción de $O_2^{\cdot-}$ de manera más moderada en astrocitos que en neuronas. Este hecho implica una producción exacerbada de $O_2^{\cdot-}$ por el complejo I en los astrocitos en condiciones basales, puesto que su inhibición no es capaz de incrementar notablemente la capacidad productora del complejo.

Figura 26. Astrocitos y neuronas estimulan la producción de $O_2^{\cdot-}$ de manera diferente con rotenona

La figura muestra los incrementos (*fold*) sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ respecto al control (sin tratamiento) en cultivos primarios de neuronas y astrocitos C57Bl6. Los datos mostrados en esta figura se han obtenido a partir de los datos representados en las Figuras 23 y 25a. * $p < 0.05$; n.s. $p > 0.05$ (*t* de Student's)



3. LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA TRANSPORTADORA MITOCONDRIAL NO ES RESPONSABLE DE LAS DIFERENCIAS EN LA PRODUCCIÓN DE ROS ENTRE NEURONAS Y ASTROCITOS

Mediante la determinación de la producción de ROS en mitocondrias aisladas y gracias al empleo de la sonda Mitosox, hemos podido demostrar la implicación de la mitocondria en la producción de ROS en astrocitos. Con el uso de los inhibidores de la cadena transportadora, el complejo I se ha presentado como un posible candidato. Es por ello, por lo que quisimos valorar la actividad específica de los complejos mitocondriales en los cultivos primarios de neuronas y astrocitos, tanto de ratones C57Bl6 como ratas Wistar.

Se determinó la actividad específica del complejo I, complejo II-III, y la constante de velocidad del complejo IV. Como carga mitocondrial se evaluó la actividad específica de la citrato sintasa.

Las determinaciones se realizaron en diferentes medios, con la finalidad de valorar la influencia de las condiciones del cultivo sobre la actividad de la cadena transportadora. Los medios testados fueron: Neurobasal AO/MAO para neuronas; DMEM y Neurobasal con B27 AO/MAO para astrocitos.

Podemos observar (**Figura 27a-d**) como no existen diferencias en la actividad específica de los complejos mitocondriales entre neuronas y astrocitos de ratones C57Bl6, en ningún condición evaluada.

En el caso de la rata Wistar (**Figura 27e-h**), observamos diferencias significativas en la actividad del complejo I entre neuronas y astrocitos, en todas las condiciones estudiadas, presentando los astrocitos ~ 7 veces más actividad que las neuronas. El resto de las actividades enzimáticas analizadas no presentaron diferencias, a excepción del complejo II-III entre neuronas y astrocitos, en medio Neurobasal MAO, donde las neuronas mostraron mayor actividad.

Estos resultados nos indican como la actividad de los complejos mitocondriales, en especial del complejo I, no parece responsable de las diferencias en la producción de ROS entre neuronas y astrocitos, dado que en ratones C57Bl6 no se observan diferencias en la actividad.

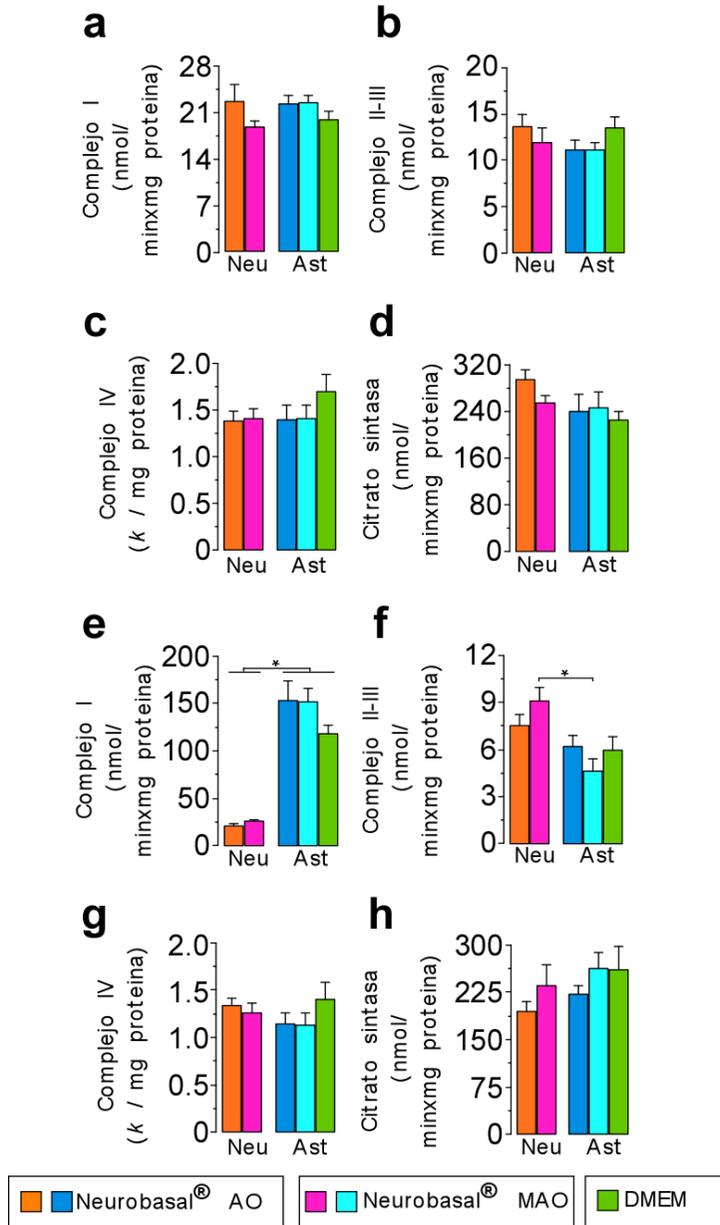


Figura 27. Determinación de actividades enzimáticas mitocondriales

(a) Actividad específica del complejo I en ratones C57Bl6. (b) Actividad específica del complejo II-III en ratones C57Bl6. (c) Constante de velocidad para el complejo IV en ratones C57Bl6. (d) Actividad específica de la citrato sintasa en ratones C57Bl6. (e) Actividad específica del complejo I en rata Wistar. (f) Actividad específica del complejo II-III en rata Wistar. (g) Constante de velocidad para el complejo IV en rata Wistar. (h) Actividad específica de la citrato sintasa en rata Wistar. * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=3)

No obstante, dada (i) la gran capacidad productora de $O_2^{\cdot-}$ descrita por el complejo I⁴, (ii) la mayor producción de ROS observada en astrocitos (**Figura 12 y 15**), (iii) la mayor actividad del complejo I mitocondrial en astrocitos Wistar en relación a neuronas^{129,142} (**Figura 27**), (iv) la existencia de un factor de ensamblaje (SCAFI) involucrado en la formación de supercomplejos⁸³, (v) la estabilidad dependiente del complejo I sobre el complejo III^{93,96}; quisimos evaluar si la diferente actividad del complejo I en astrocitos Wistar podría ser consecuencia de la presencia de SCAFI.

Las ratas Wistar expresan la isoforma funcional de SCAFI, que podría estabilizar el complejo I al favorecer la formación de supercomplejos. Es por ello, por lo que la mayor actividad del complejo I en astrocitos Wistar podría ser la responsable de las diferencias observadas en la producción de ROS, como consecuencia de una mayor estabilidad del complejo I, a pesar de la ausencia de diferencias en la actividad del complejo I entre neuronas y astrocitos C57Bl6. Para esclarecer la contribución del complejo I sobre la producción de ROS, se determinaron las actividades específicas de los complejos mitocondriales en ratones CBA-J y CD-1, con expresión funcional del factor SCAFI, de forma similar a la rata Wistar, y a diferencia de los ratones C57Bl6.

En la **Figura 28** podemos observar cómo, a grandes rasgos, no existen diferencias en las actividades de los complejos mitocondriales, entre neuronas y astrocitos en las dos cepas de ratón analizadas. No obstante, en el caso del complejo I en ratones CBA-J (**Figura 28a**) observamos un incremento en la actividad en astrocitos respecto a neuronas, de ~1.5 veces, no resultando tan elevado como en rata Wistar (~7 veces). Para los ratones CD-1 observamos diferencias en la constante de velocidad del complejo IV (**Figura 28g**) en los astrocitos en medio Neurobasal, respecto a neuronas y a la condición de DMEM.

Mediante la determinación de la actividad específica de los complejos mitocondriales en diferentes cepas y especies, hemos podido descartar la actividad de los complejos, especialmente el complejo I, como el factor responsable de las diferencias en la producción de ROS observadas entre neuronas y astrocitos.

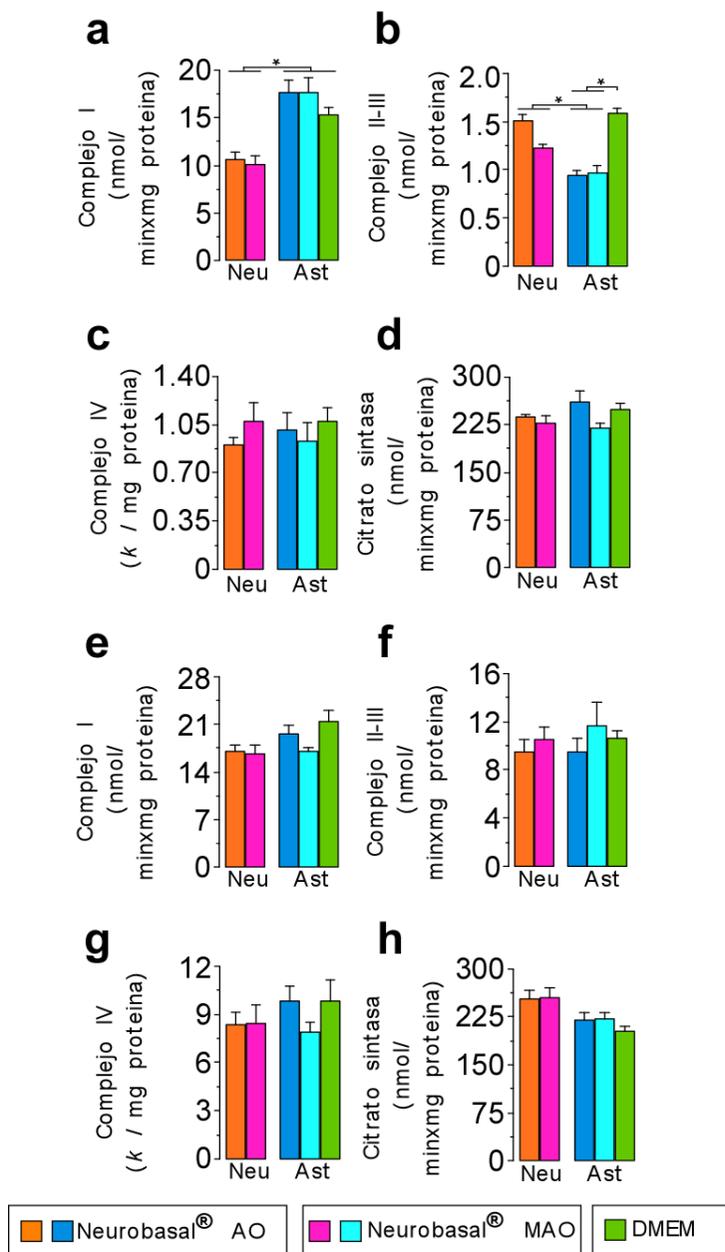


Figura 28. Determinación de actividades enzimáticas mitocondriales

(a) Actividad específica del complejo I en ratones CBA-J. (b) Actividad específica del complejo II-III en ratones CBA-J. (c) Constante de velocidad para el complejo IV en ratones CBA-J. (d) Actividad específica de la citrato sintasa en ratones CBA-J. (e) Actividad específica del complejo I en ratones CD-1. (f) Actividad específica del complejo II-III en ratones CD-1. (g) Constante de velocidad para el complejo IV en ratones CD-1. (h) Actividad específica de la citrato sintasa en ratones CD-1. * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=3)

4. LA GENERACIÓN DE $O_2^{\cdot-}$ POR EL TRANSPORTE REVERSO DE ELECTRONES NO ES RESPONSABLE DE LAS DIFERENCIAS EN LA PRODUCCIÓN DE ROS

Mediante el empleo del inhibidor del complejo I rotenona, hemos podido observar (**Figura 26**) diferencias en la estimulación de la producción de $O_2^{\cdot-}$ por el complejo I entre neuronas y astrocitos.

La rotenona presenta un efecto ambivalente sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ en el complejo I, incrementando los niveles durante el transporte directo de electrones, y bloqueando la generación de $O_2^{\cdot-}$ en el transporte reverso. Es por ello, por lo que pensamos si el menor incremento observado tras la estimulación de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en astrocitos, con rotenona, podría deberse a un mecanismo compensatorio sobre la producción de ROS durante el transporte directo y reverso de electrones en el complejo I.

Para dilucidar este aspecto, se inhibió la actividad del complejo II con la finalidad de bloquear el transporte reverso de electrones. Para ello, los cultivos primarios de neuronas y astrocitos C57Bl6 se trataron con el inhibidor del complejo II 3NP durante 1 hora a 0.5 y 1 mM. El tratamiento con 3NP disminuyó la actividad del complejo II (**Figura 29a**) a las diferentes concentraciones estudiadas, tanto en neuronas como astrocitos, sin afectar la capacidad mitocondrial, puesto que la actividad de la citrato sintasa no se modificó tras el tratamiento (**Figura 29b**).

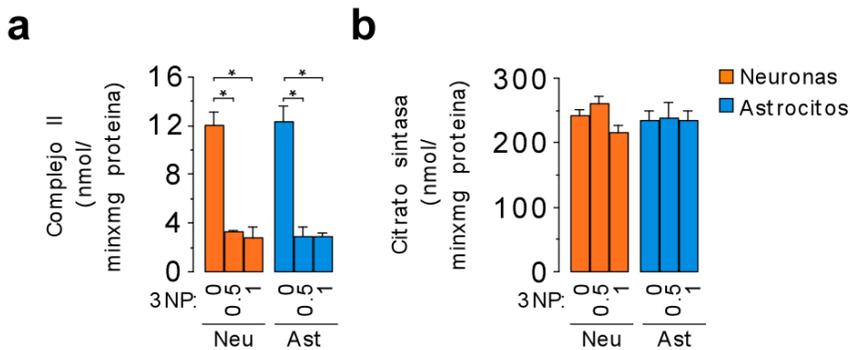


Figura 29. El 3NP inhibe al complejo II sin afectar a la actividad de la citrato sintasa

La actividad específica del (a) complejo II y (b) la citrato sintasa se determinaron tras el tratamiento de los cultivos primarios de neuronas y astrocitos C57Bl6 con 3NP (0.5 y 1 mM) durante 1 hora.

* $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=3)

En estas condiciones de inhibición del complejo II (tratamiento con 3NP), se determinaron los niveles de $O_2^{\cdot-}$ (Mitoxox) en neuronas y astrocitos (**Figura 30**), observándose un incremento a la dosis 1 mM en neuronas, y una ausencia de efecto en astrocitos.

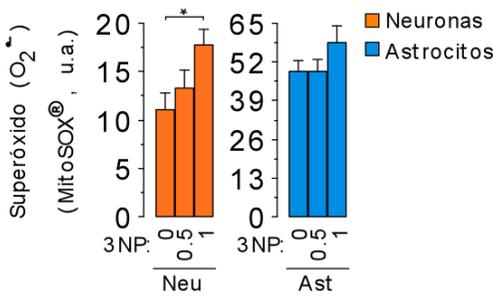


Figura 30. Los niveles de $O_2^{\cdot-}$ no se modifican en astrocitos tras el tratamiento con 3NP, pero se incrementan en neuronas

Determinación de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en cultivos primarios de neuronas y astrocitos tras el tratamiento con 3NP a las dosis 0.5 y 1 mM durante 1 hora. * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=3)

La ausencia de efecto sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ en los cultivos de astrocitos resultó un indicativo de la no contribución del transporte reverso de electrones sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$. De ser así, hubiésemos observado una disminución en la producción en astrocitos. El incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en neuronas se debió al efecto tóxico del 3NP, debido a la activación de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) y entrada de Ca^{2+} ¹⁴³.

5. LOS ASTROCITOS PRESENTAN ELEVADOS NIVELES DE COMPLEJO I DESACTIVADO, REDUCIENDO EL CONSUMO DE O_2 A TRAVÉS DEL COMPLEJO

Dado los altos niveles de producción de $O_2^{\cdot-}$ por la mitocondria en los astrocitos (Figura 15), quisimos valorar si el estrés oxidativo afectaba a la actividad del complejo I, incrementando los niveles de complejo I desactivado (D). Este proceso podría producirse como consecuencia de un menor recambio del complejo I ⁷².

Para ello, valoramos la actividad del complejo en presencia de NEM, que bloquea la transición entre las formas D y A. En presencia de NEM, la actividad del complejo I observada es debida únicamente a la forma activa (A) del complejo. La determinación del complejo I en presencia de NEM, a partir de homogenados celulares de astrocitos y neuronas C57BL6, demostró como las neuronas no disminuyen la actividad del complejo (Figura 31a) significativamente. En cambio, en los astrocitos se observó una reducción en la actividad del complejo en torno al ~35%. Estos resultados son indicadores de una mayor acumulación del complejo I desactivado en astrocitos (Figura 31b), a diferencia de neuronas, posiblemente como consecuencia de los altos niveles de ROS.

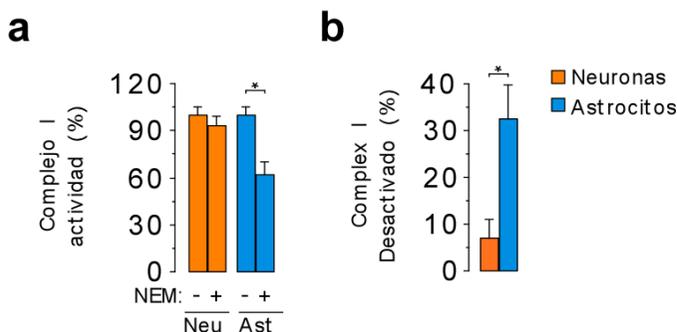


Figura 31. Los astrocitos presentan mayor proporción del complejo I desactivado

(a) Determinación del % de actividad del complejo I en presencia y ausencia de NEM, en cultivos primarios de neuronas y astrocitos C57Bl6. (b) Porcentaje de complejo I desactivado en cultivos primarios de neuronas y astrocitos C57Bl6. * $p < 0.05$ (t de Student's) ($n=3$)

Dado el diferente % de complejo I desactivo entre neuronas y astrocitos, quisimos evaluar el consumo de O_2 a través del complejo. Para ello, se determinó la respiración mitocondrial dependiente de piruvato/malato (en presencia de ADP), observándose una menor respiración en astrocitos (Figura 32).

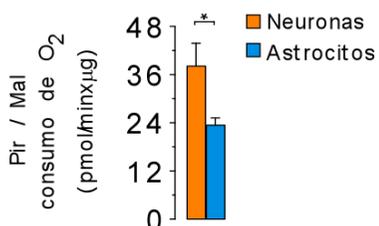


Figura 32. Los astrocitos consumen menos O_2 en presencia de piruvato/malato

Consumo de O_2 dependiente de piruvato (Pir) y malato (Mal) en mitocondrias aisladas a partir de cultivos primarios de neuronas y astrocitos C57Bl6. * $p < 0.05$ (t de Student's) ($n=2$)

Estos resultados evidencian una menor capacidad oxidativa del complejo I por parte de los astrocitos, que concuerda con la mayor acumulación de complejo I desactivado, dado que esta forma del complejo no acopla el consumo de sustratos con la transferencia electrónica⁷². Además, el menor consumo de oxígeno en los astrocitos implica una menor fosforilación oxidativa, concordante con la mayor tasa glucolítica asociada a los astrocitos^{133,144}. No obstante, los astrocitos podrían mantener el potencial de membrana gracias a la actividad antiporter Na^+/H^+ del complejo I en su forma desactivada⁷².

6. DIFERENCIAS EN EL ENSAMBLAJE DEL COMPLEJO I EXPLICAN LA DIFERENTE PRODUCCIÓN DE ROS ENTRE NEURONAS Y ASTROCITOS

Dada la habilidad de los complejos mitocondriales de organizarse en supercomplejos, y como esta organización es capaz de afectar a la producción de ROS ⁷⁷, e incrementar la eficiencia en la transferencia electrónica ^{86,87}, quisimos estudiar la organización del complejo I en la mitocondria de neuronas y astrocitos.

Para ello, solubilizamos las mitocondrias en presencia digitonina (4g/g) ⁸⁰, y las sometimos a BNGE. Posteriormente realizamos un ensayo de actividad del complejo I en gel (IGA-CI), para identificar las bandas en las que se localiza el complejo. Este ensayo lo realizamos en cultivos de astrocitos de las diferentes especies y cepas estudiadas (ratas Wistar y ratones C57Bl6, CD-1 y CBA-J) (**Figura 33**). Observamos 4 bandas con actividad NADH oxidasa para las cepas CD-1 y CBA-J de ratón, y rata Wistar, correspondientes a los supercomplejos I₂+III₂, I+III₂+IV, I+III₂, y complejo I. En el caso de los ratones C57Bl6 solo observamos 3 bandas, debido a la ausencia de SCAFI funcional, que hace que el supercomplejo I+III₂+IV no se encuentre presente. La confirmación de que las bandas con actividad poseían al complejo I se realizó mediante 2D-SDS-PAGE (**Figura 33**).

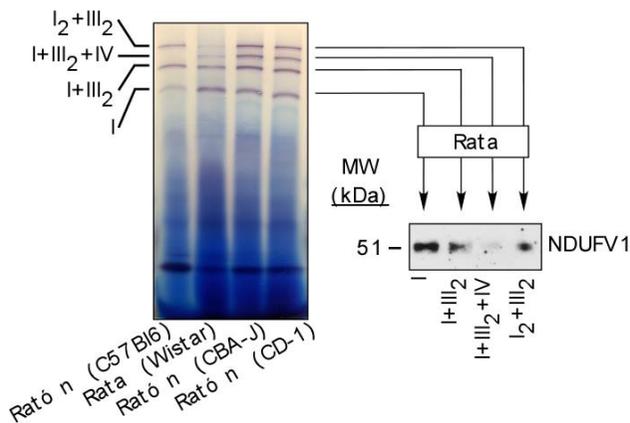


Figura 33. Organización de la cadena transportadora mitocondrial en astrocitos

Ensayo de actividad del complejo I, tras BNGE, en mitocondrias solubilizadas con digitonina (4g/g) en astrocitos de ratón C57Bl6, CD-1, CBA-J y rata Wistar. Las bandas con actividad NADH oxidasa presentan una coloración morada. A continuación se realizó una 2D-SDS-PAGE de las bandas identificadas con actividad NADH oxidasa, en ratas Wistar, frente a la subunidad del complejo I mitocondrial, NDUFV1.

Para corroborar la presencia del complejo III en los supercomplejos identificados se realizó la transferencia directa de una BNGE, de astrocitos C57Bl6, con posterior detección del complejo I (NDUFB8) y complejo III (UQCRC2). Mediante esta aproximación pudimos demostrar la presencia del complejo I y el complejo III en los supercomplejos I₂+III₂ e I+III₂, así como detectar los complejos individuales, I y III₂ (**Figura 34**).

Asimismo, observamos una diferente organización de los complejos entre neuronas y astrocitos (C57Bl6), presentando mayor acumulación de complejo I y III en el

supercomplejo I+III₂ las neuronas, y mayores niveles del complejo I libre los astrocitos. El complejo III (III₂) en su forma libre, resultó más abundante en las neuronas que los astrocitos (**Figura 34**).

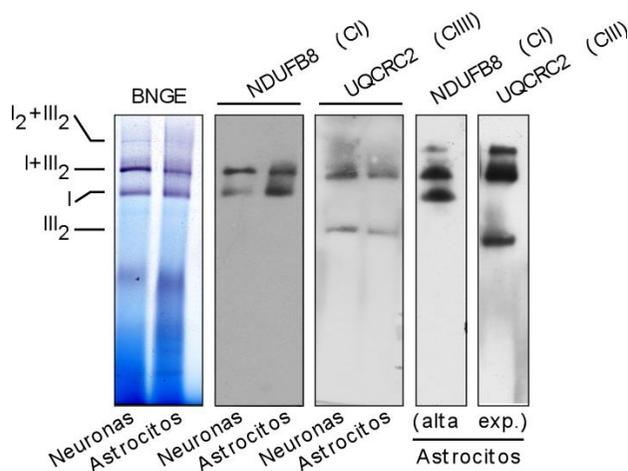


Figura 34. Astrocitos y neuronas presentan una diferente organización de los CI y CIII

Tras la realización de BNGE en neuronas y astrocitos C57Bl6 se realizó la transferencia directa con posterior inmunodetección del complejo I (NDUFB8) y complejo III (UQCRC2). Se muestra una imagen correspondiente a una alta exposición en el caso de astrocitos, para poder visualizar el supercomplejo I₂+III₂.

Debido a las diferencias observadas entre los complejos I y III entre neuronas y astrocitos, quisimos evaluar cómo se encontraban los niveles de estos complejos en homogenados celulares. Para ello, se realizó una transferencia tipo Western, con posterior inmunodetección de las subunidades NDUFB8 (CI) y UQCRC2 (CIII), a partir de lisados celulares. Mediante esta aproximación observamos una mayor acumulación de complejo I, en relación a la abundancia del complejo III, en astrocitos (**Figura 35**). Esta observación nos hizo pensar en un mayor acoplamiento entre los complejos respiratorios en neuronas, compatible con una menor producción de ROS.

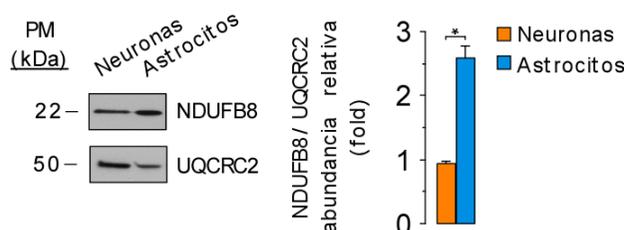


Figura 35. Astrocitos y neuronas presentan diferentes niveles de los complejos I y III

Transferencia tipo Western e inmunodetección de NDUFB8 (CI) y UQCRC2 (CIII) en lisados celulares de neuronas y astrocitos C57Bl6. Se muestra la cuantificación de la abundancia relativa (*fold*) de NDUFB8/UQCRC2. * $p < 0.05$ (*t* de Student's) ($n=3$)

A continuación, realizamos BNGE+IGA-CI en neuronas y astrocitos de ratas Wistar. En el gel (**Figura 36a**) observamos una mayor actividad del complejo I en la banda correspondiente al I+III₂ en el caso de neuronas. Para confirmar si existía una diferente organización del complejo I entre neuronas y astrocitos, se realizó una 2D de las bandas correspondientes a supercomplejos (SC) y al complejo I libre (CI) (**Figura 36b**), en la que se detectó NDUFV1. Observamos como en las neuronas, la abundancia del complejo I en supercomplejos es mayor que en astrocitos, donde se encontró más complejo I libre. Se muestra la cuantificación densitométrica de NDUFV1 tras 2D-SDS-PAGE de diferentes experimentos (**Figura 36c**).

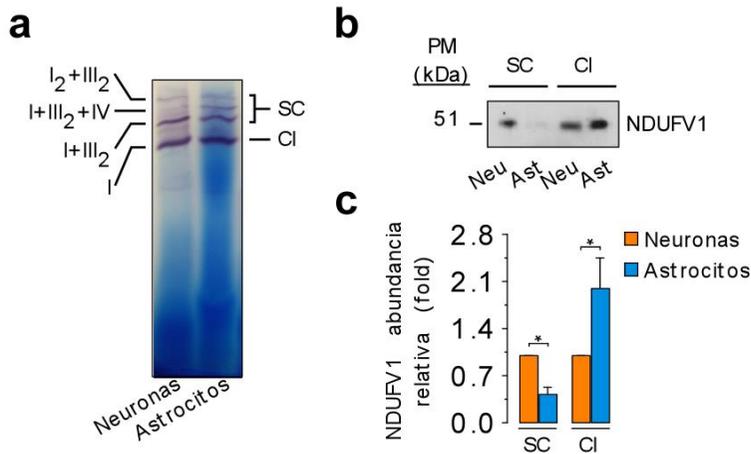


Figura 36. Neuronas y astrocitos Wistar muestran una diferente organización del CI

(a) BNGE+IGA-CI en neuronas y astrocitos Wistar. **(b)** 2D-SDS-PAGE en SC y CI frente a NDUFV1. **(c)** Cuantificación densitométrica de la abundancia de NDUFV1 en las distintas regiones, en relación a su abundancia en neuronas. * $p < 0.05$ (*t* de Student's) (n=3)

La abundancia relativa de las subunidades del complejo I a lo largo de las diferentes posiciones de un gel BNGE se evaluó mediante espectrometría de masas. Con la realización de este análisis se observó una mayor abundancia de las subunidades del complejo I en la región de los supercomplejos en neuronas. Sin embargo, en el caso de los astrocitos, la abundancia de las subunidades en la región del complejo I libre fue mayor. En la **Figura 37** se representa el promedio de cuatro análisis independientes de espectrometría de masas. En el diagrama (**Figura 37a**) se observa la abundancia relativa de las subunidades a lo largo de las posiciones mediante una escala colorimétrica, junto a la cuantificación de la abundancia relativa de las subunidades en el complejo I libre frente a supercomplejos (**Figura 37b**).

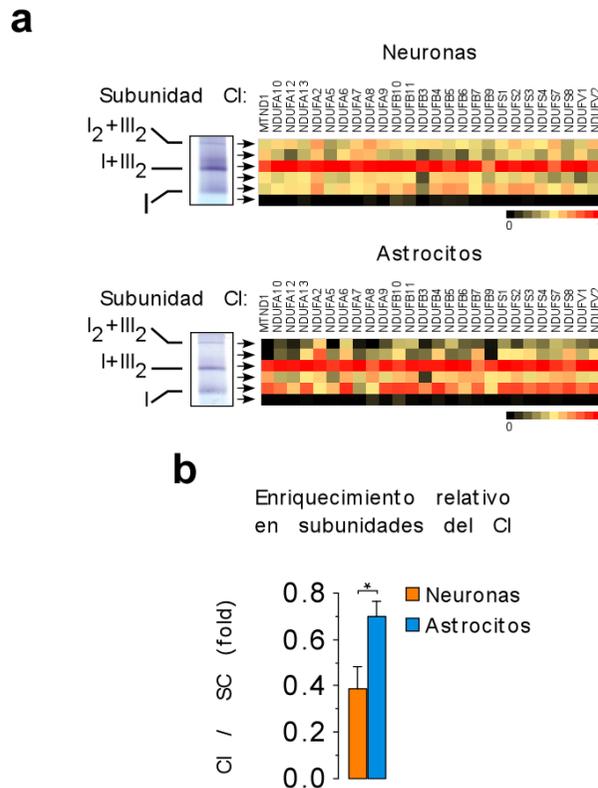


Figura 37. Las subunidades del CI se organizan diferencialmente en neuronas y astrocitos

(a) Representación gráfica en el que se muestra la abundancia de las subunidades del complejo I en las diferentes posiciones del gel, para neuronas y astrocitos C57Bl6, mediante una escala colorimétrica. (b) Cuantificación de la abundancia relativa promedio de las subunidades en la región del complejo I libre frente a los supercomplejos (I₂+III₂ + I+III₂), en neuronas y astrocitos. * $p < 0.05$ (t de Student's) (n=4)

La diferente organización del complejo I en neuronas y astrocitos de ratones C57Bl6 fue confirmada mediante el mismo abordaje experimental empleado en ratas Wistar (BNGE-IGA seguido de 2D-SDS-PAGE con detección de NDUFV1) (Figura 38).

Puesto que el complejo I es un complejo multiproteico, y dada la reciente descripción de variaciones en la abundancia relativa de subunidades en el módulo N, asociadas a variaciones en los niveles de ROS¹⁰⁶, evaluamos si la organización de NDUFV1 correspondía con la subunidad NDUFS1. Se seleccionó la subunidad del módulo N NDUFS1 dada su implicación en el proceso de transferencia electrónica, al albergar 3 de los 8 centros Fe-S del complejo. Observamos (Figura 38), como las neuronas presentan más NDUFS1 en supercomplejos en relación a los astrocitos, tal y como ocurre con NDUFV1. No obstante, en el complejo I libre se encontró una organización diferencial a la

observada para NDUFV1, dado que en los astrocitos se reduce la abundancia de NDUFS1 en comparación con las neuronas.

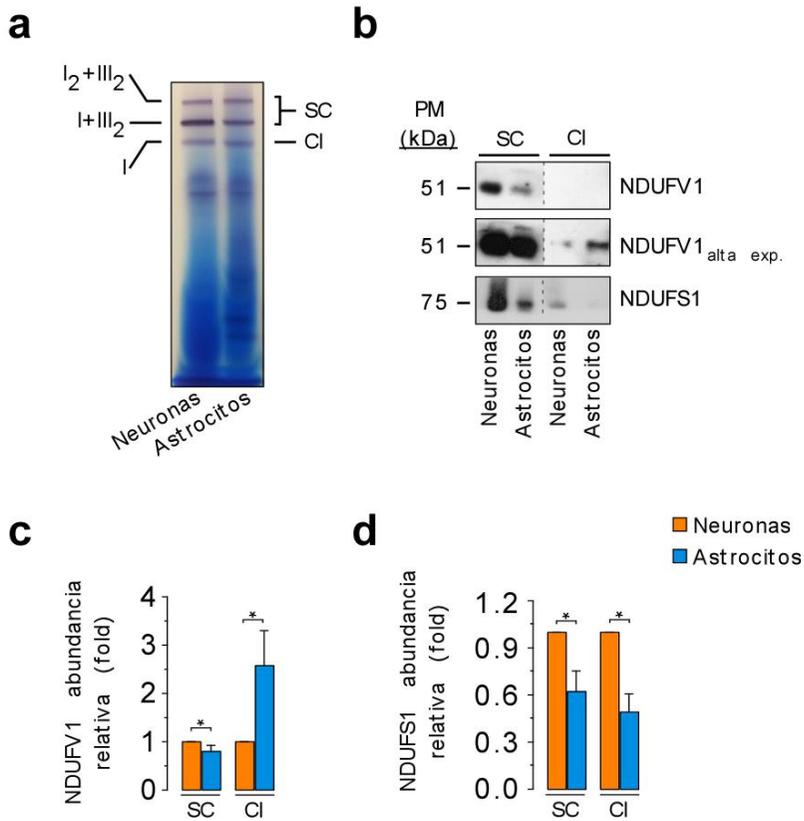


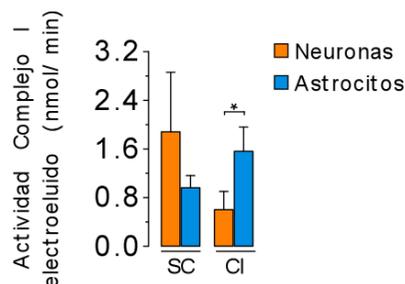
Figura 38. Neuronas y astrocitos C57Bl6 presentan una diferente organización del complejo I, con diferente abundancia de la subunidad NDUFS1 en el complejo I libre (a) BNGE+IGA-CI en neuronas y astrocitos C57Bl6. (b) 2D-SDS-PAGE en supercomplejos y complejo I frente a NDUFV1 (se muestra una alta y baja exposición) y NDUFS1. (c) Cuantificación densitométrica de la abundancia de (c) NDUFV1 y (d) NDUFS1 en las distintas regiones, en relación a su abundancia en neuronas. * $p < 0.05$ (t de Student's) ($n=3$)

Dada la similitud existente en cuanto a la organización del complejo I entre neuronas y astrocitos de rata Wistar y ratón C57Bl6, los siguientes experimentos se realizaron únicamente en ratones C57Bl6.

El complejo I libre y los supercomplejos se electroeluyeron del gel y la actividad del complejo I se determinó a partir del electroeluido. Podemos observar (**Figura 39**) una mayor actividad del complejo en el complejo I libre de los astrocitos, confirmando su mayor acumulación en la forma libre en este tipo celular. En este ensayo, actividad y acumulación son sinónimos, puesto que una mayor acumulación del complejo I en una región lleva asociado un incremento en su actividad como consecuencia de sus mayores niveles.

Figura 39. El complejo I libre presenta mayor actividad en astrocitos

La actividad específica del complejo I se determinó a partir de electroeluidos proteicos de neuronas y astrocitos en la región de los supercomplejos y del complejo I libre. * $p < 0.05$ (t de Student's) ($n=4$)



Con la finalidad de discernir si la organización del complejo I era responsable de la diferente producción de ROS, se valoró la generación de H_2O_2 a partir de los fragmentos de gel correspondientes al complejo I y la región de los supercomplejos. Observamos (**Figura 40**) como el complejo I libre de los astrocitos produce más H_2O_2 que el de las neuronas. Resulta remarcable la capacidad de producción de H_2O_2 de los supercomplejos de los astrocitos, dado que producen lo mismo que las neuronas a pesar de su menor abundancia.

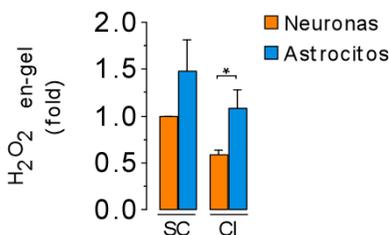


Figura 40. El complejo I libre de astrocitos produce mayores niveles de H_2O_2

La producción de H_2O_2 se determinó a partir de los fragmentos de gel correspondientes al complejo I y la región de los supercomplejos en neuronas y astrocitos. Los valores se encuentran normalizados (*fold*) respecto a la actividad NADH oxidasa tras BNGE, y frente a la producción observada en SC de neuronas. * $p < 0.05$ (t de Student's) ($n=4$)

Es por ello, por lo que la diferente organización y composición del complejo I parece ser el factor responsable de las diferencias en la producción de ROS entre neuronas y astrocitos. Así pues, las neuronas presentan al complejo I organizado en supercomplejos, minimizando la generación de ROS. Por el contrario, los astrocitos cuentan con una mayor abundancia del complejo I libre, incrementando la generación de ROS. Además, la composición del complejo I libre difiere entre neuronas y astrocitos, presentando los astrocitos reducidos niveles de la subunidad NDUF51 en relación a NDUFV1.

Estos resultados concuerdan con lo descrito por Maranzana *et. al* ⁷⁷. Estos autores describieron una mayor producción de O_2^- por el complejo I libre. La mayor abundancia de complejo I libre permitiría al grupo FMN tener mayor accesibilidad al O_2 , incrementando la producción de O_2^- ⁷⁷. La diferente composición del complejo I entre neuronas y astrocitos podría estar incrementando los niveles de O_2^- como consecuencia

de una menor transferencia electrónica hacia la ubiquinona, al carecer el complejo de astrocitos de la subunidad NDUFS1. Todos estos factores estarían contribuyendo en un ciclo positivo de incremento de $O_2^{\cdot-}$ y desestabilización de supercomplejos en astrocitos.

La menor abundancia de NDUFS1 en el complejo I de astrocitos podría ser consecuencia de un mayor daño oxidativo, lo que incrementaría su recambio, reduciendo la proporción de complejo I completamente ensamblado en los astrocitos.

7. EL SILENCIAMIENTO DE NDUFS1 EN NEURONAS MODULA EL ENSAMBLAJE DEL COMPLEJO I E INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE ROS

Dada la variación en el contenido de las subunidades NDUFS1 y NDUFV1 en el complejo I, entre neuronas y astrocitos, quisimos evaluar si con su modulación, mediante siRNA o sobreexpresiones, éramos capaces de afectar a la producción de ROS y/o al ensamblaje del complejo.

Para ello, silenciamos la subunidad NDUFS1 en cultivos primarios de neuronas, puesto que el complejo I libre en este tipo celular presentó mayores niveles de esta subunidad en comparación con astrocitos (**Figura 38**).

El funcionamiento del siRNA de NDUFS1 en neuronas se confirmó mediante una transferencia tipo Western. Se observó (**Figura 41a, b**) una reducción en los niveles de NDUFS1 cercanos al 50% tras el silenciamiento. El silenciamiento de NDUFS1 se acompañó de un incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial (**Figura 41c**).

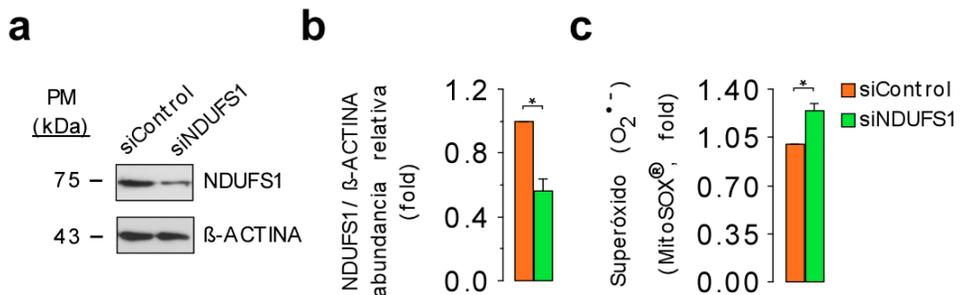


Figura 41. La reducción de NDUFS1 en neuronas incrementó los niveles de $O_2^{\cdot-}$

(a) Evaluación del silenciamiento de NDUFS1 en cultivos primarios de neuronas mediante transferencia tipo Western. **(b)** Cuantificación densitométrica de la abundancia relativa (*fold*) de NDUFS1 frente al control de carga β -actina, referenciada a los niveles en la situación control (siControl) (n=3). **(c)** Determinación de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en cultivos de neuronas tras el silenciamiento de NDUFS1. Los niveles se encuentran normalizados (*fold*) frente la situación control (siControl). * $p < 0.05$ (*t* de Student's) (n=3)

En estas condiciones de incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$, silenciando NDUFS1, valoramos si se producían cambios en la organización del complejo I. Para ello,

realizamos BNGE+IGA-CI seguido de 2D-SDS-PAGE (**Figura 42**). Se observó una reducción en la estabilidad del complejo I libre y en el contenido de supercomplejos, apreciable en el ensayo de actividad en gel y en la 2D.

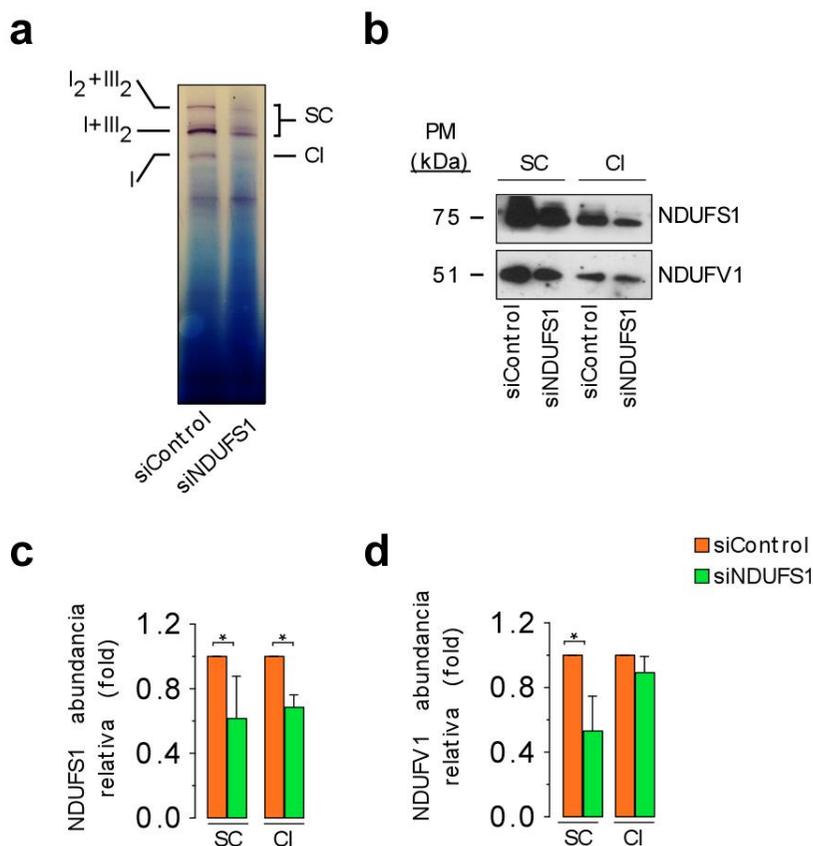


Figura 42. El silenciamiento de NDUFS1 modificó la organización del complejo I

(a) BNGE+IGA tras el silenciamiento de NDUFS1. (b) 2D-SDS-PAGE de la región de supercomplejos y complejo I, detectando NDUFV1 y NDUFS1. Cuantificación densitométrica de la abundancia de (c) NDUFS1 y (d) NDUFV1 en las distintas bandas, en relación a su abundancia en la condición control (siControl) (fold). * $p < 0.05$ (t de Student's) ($n=3$)

La producción de H_2O_2 a partir de los fragmentos del gel correspondientes a la región de los supercomplejos y del complejo I libre, se realizó tras el silenciamiento de NDUFS1 (**Figura 43**). La producción en las distintas regiones se referenció a la producción observada en los supercomplejos de la condición control. El silenciamiento de NDUFS1 incrementó la producción de H_2O_2 en los supercomplejos de manera significativa. En la región del complejo I libre se observó un incremento en la producción, aunque este no resultó estadísticamente significativo.

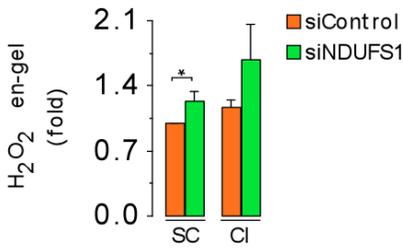


Figura 43. El silenciamiento de NDUFS1 incrementó la producción de H₂O₂

La producción de H₂O₂ se determinó a partir de los fragmentos de gel correspondientes al complejo I y los supercomplejos en neuronas siControl y siNDUFS1. La producción se encuentra normalizada frente a la actividad NADH oxidasa en las diferentes regiones del gel, y frente a la producción en SC-siControl. * $p < 0.05$ (t de Student's) (n=6)

Estos experimentos evidencian como afectando a la composición el complejo I, mediante el silenciamiento de NDUFS1 en neuronas, se incrementa la producción de O₂⁻ mitocondrial, y se modifica el ensamblaje del complejo I. Tras el silenciamiento se reducen los niveles de supercomplejos y del complejo I libre. Este efecto podría estar mediado por la mayor producción de ROS en el complejo I silenciado, que afectaría, mediante un ciclo positivo, al ensamblaje del complejo I en supercomplejos (reduciéndolo). Además, reduciría la abundancia del complejo I como consecuencia de un mayor daño oxidativo.

8. LA SOBREENEXPRESIÓN DE NDUFS1 EN ASTROCITOS MODULA EL ENSAMBLAJE DEL COMPLEJO I Y REDUCE LA PRODUCCIÓN DE ROS

La sobreexpresión de NDUFS1 en cultivos primarios de astrocitos se realizó mediante la transfección de las células con un plásmido que contiene la secuencia codificante de NDUFS1. Para corroborar la correcta expresión de la proteína en las células, se realizó la transferencia tipo Western, observándose un incremento en la cantidad de proteína cercano al 50% (**Figura 44a, b**).

Tras la sobreexpresión de NDUFS1 se evaluaron los niveles de O₂⁻, mediante Mitosox, en cultivos primarios de astrocitos (**Figura 44c**), observándose una reducción en los niveles de O₂⁻ mitocondrial en relación a las células control.

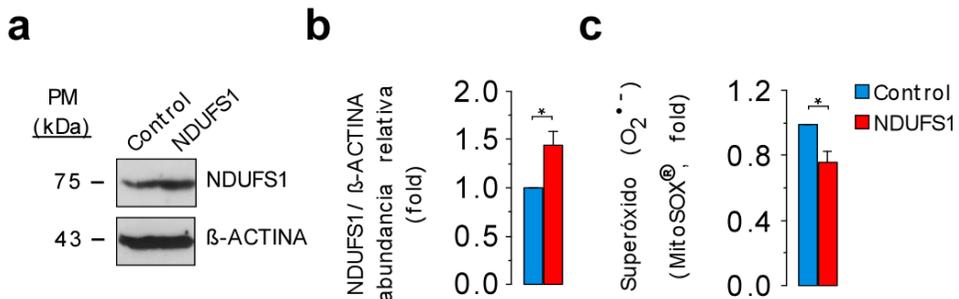


Figura 44. La sobreexpresión de NDUFS1 en astrocitos redujo los niveles de O₂⁻

(a) Evaluación de la sobreexpresión de NDUFS1 en cultivos primarios de astrocitos mediante transferencia tipo Western. (b) Cuantificación densitométrica de la abundancia relativa (fold) de NDUFS1 frente al control de carga β-actina, referenciada a los niveles en la situación control

(pcDNA3.1) (n=3). **(c)** Determinación de los niveles de $O_2^{\cdot -}$ en cultivos de astrocitos tras la sobreexpresión de NDUFS1. Los niveles se encuentran normalizados (*fold*) frente a la situación control (pcDNA3.1) (n=3). * $p < 0.05$ (*t* de Student's)

Para comprobar si la sobreexpresión de NDUFS1 era capaz de modular el ensamblaje de los supercomplejos, se realizó BNGE+IGA seguido de 2D-SDS-PAGE (**Figura 45**). Se observó un incremento de los supercomplejos y del complejo I, apreciable en el ensayo de actividad en gel y en la 2D.

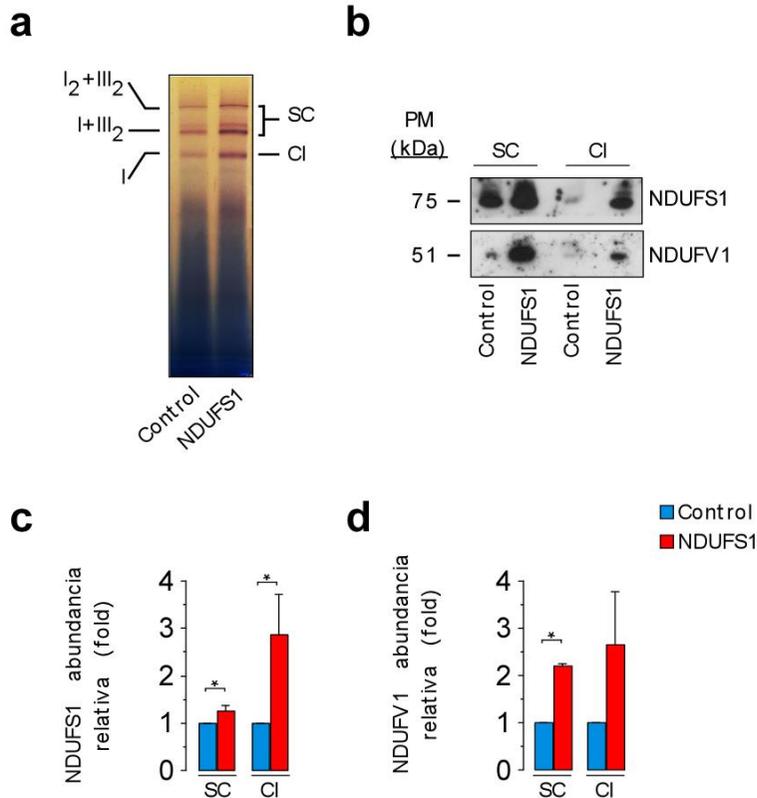


Figura 45. La sobreexpresión de NDUFS1 modificó la organización del complejo I

(a) BNGE+IGA tras la sobreexpresión de NDUFS1. **(b)** 2D-SDS-PAGE de la región de supercomplejos y complejo I, detectando NDUFV1 y NDUFS1. Cuantificación densitométrica de la abundancia de **(c)** NDUFS1 y **(d)** NDUFV1 en las distintas bandas, en relación a su abundancia en la situación control (pcDNA3.1) (*fold*). * $p < 0.05$ (*t* de Student's) (n=3)

La producción de H_2O_2 se determinó a partir de fragmentos del gel correspondientes a la región de los supercomplejos y del complejo I libre, en las células sobreexpresadas (**Figura 46**). Se observó una reducción en la producción de H_2O_2 tanto en la región de los supercomplejos, como por el complejo I.

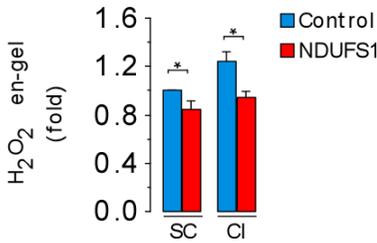


Figura 46. La sobreexpresión de NDUFS1 redujo la producción de H₂O₂

La producción de H₂O₂ se determinó a partir de los fragmentos de gel correspondientes al complejo I y los supercomplejos en astrocitos Control (pcDNA3.1) y tras la sobreexpresión de NDUFS1. La producción se encuentra normalizada frente a la actividad NADH oxidasa en las diferentes regiones del gel, y frente a la producción en SC-Control. * $p < 0.05$ (t de Student's) ($n=5$)

Mediante la sobreexpresión de NDUFS1 en astrocitos se ha podido demostrar como la composición proporcionada de subunidades en el complejo I reduce los niveles de O₂⁻ mitocondrial, afectando a la capacidad productora del complejo I. Además, se modifica el ensamblaje del complejo, incrementándose los niveles de los supercomplejos, y del complejo I libre. La mayor acumulación del complejo I libre posiblemente ocurra como consecuencia de su mayor estabilidad gracias a la mejora de su composición. El mayor ensamblaje en supercomplejos posiblemente favorezca la menor producción de ROS mediante un ciclo positivo.

Con estos resultados podemos concluir como la modulación de la composición del complejo I afecta, no solo a la producción de ROS, sino al ensamblaje de los supercomplejos. Este hecho nos invita a pensar que la composición del complejo I en astrocitos favorece la generación de ROS reduciendo la formación de supercomplejos.

9. EL TRATAMIENTO CON ANTIOXIDANTES MODULA EL ENSAMBLAJE DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES Y SU PRODUCCIÓN DE ROS

Gracias a los experimentos realizados hemos observado como la modulación del ensamblaje del complejo I en supercomplejos afectaba a la producción de ROS. Por tanto, quisimos estudiar si el tratamiento de las células con antioxidantes era capaz de modular el ensamblaje.

Para ello, se trataron astrocitos en cultivo primario con GSH-EE, y se valoró la producción de O₂⁻ (**Figura 47**). El tratamiento con GSH-EE redujo los niveles de O₂⁻ significativamente.

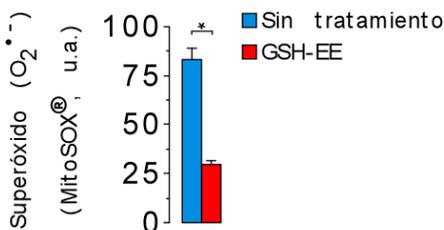


Figura 47. El tratamiento con GSH-EE redujo los niveles de O₂⁻

Astrocitos en cultivo primario se trataron durante 24 horas con GSH-EE 5 mM. Los niveles de O₂⁻ se determinaron mediante la sonda Mitosox (u.a.). * $p < 0.05$ (t de Student's) ($n=3$).

Realizamos BNGE+IGA seguido de 2D-SDS-PAGE en la región de los supercomplejos y del complejo I. Se observó un incremento en la cantidad de complejo I en la región de los supercomplejos y del complejo I libre (**Figura 48**).

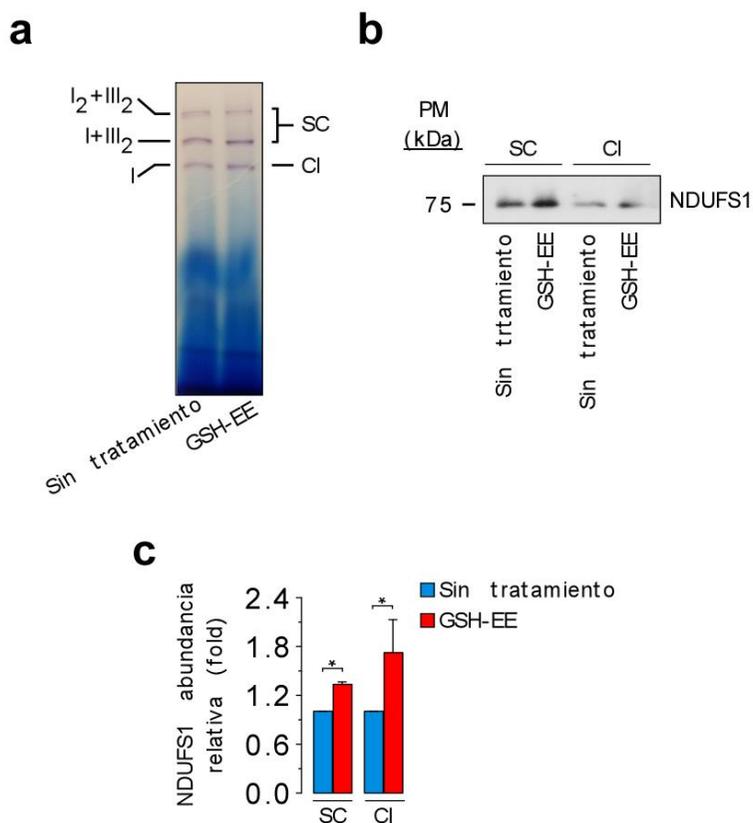


Figura 48. El tratamiento con GSH-EE modificó la organización del complejo I

(a) BNGE+IGA tras el tratamiento con GSH-EE (5 mM 24 horas). (b) 2D-SDS-PAGE de la región de supercomplejos y complejo I, detectando NDUFS1. (c) Cuantificación densitométrica de la abundancia de NDUFS1 en las distintas bandas, en relación a su abundancia en la situación control (sin tratamiento) (fold). * $p < 0.05$ (t de Student's) ($n=3$)

Se determinó la producción de H_2O_2 a partir de los fragmentos del gel correspondientes a la región de los supercomplejos y complejo I libre (**Figura 49**), observándose una disminución en la producción, tanto en supercomplejos como en complejo I, tras el tratamiento con GSH-EE.

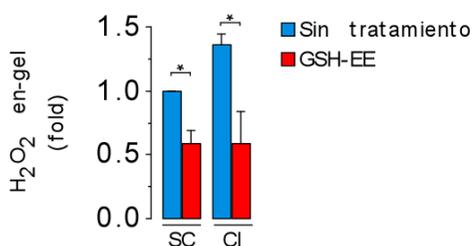


Figura 49. El tratamiento con GSH-EE redujo la producción de H₂O₂

La producción de H₂O₂ se determinó a partir de los fragmentos de gel correspondientes al complejo I y los supercomplejos en astrocitos sin tratamiento y en presencia de GSH-EE. La producción se encuentra normalizada frente a la actividad NADH oxidasa en las diferentes regiones del gel. * $p < 0.05$ (t de Student's) (n=3)

Por tanto, el tratamiento con GSH-EE favorece la organización del complejo I en supercomplejos, reduciendo la generación de ROS por el complejo I. Es decir, la reducción de las ROS estabiliza al complejo I, favoreciendo su organización en supercomplejos y reduciendo la generación de ROS a nivel mitocondrial y por parte del complejo I.

10. LA PRODUCCIÓN DE ROS EN LOS ASTROCITOS EJERCE UN PAPEL SEÑALIZADOR

Dados los altos niveles de ROS observados en los astrocitos, quisimos evaluar si podrían estar ejerciendo un papel señalizador.

Para ello, redujimos los niveles de ROS mitocondriales en los astrocitos, mediante la expresión de la catalasa fusionada a un epítipo de localización mitocondrial (mitoCAT). Los niveles de O₂⁻ se redujeron en los cultivos de astrocitos tras la expresión de mitoCAT (**Figura 50a**). Esta reducción se produjo como consecuencia de una mayor reducción del H₂O₂ en H₂O ejercida por la catalasa en el interior de la mitocondria.

En estas circunstancias, se valoraron los niveles de los factores de transcripción NRF2 y HIF1 α , observándose una reducción en ambas proteínas (**Figura 50b**). La menor abundancia de NRF2 se acompañó de una merma en la expresión de sus genes diana, *HO-1* y *GCL catalítica*.

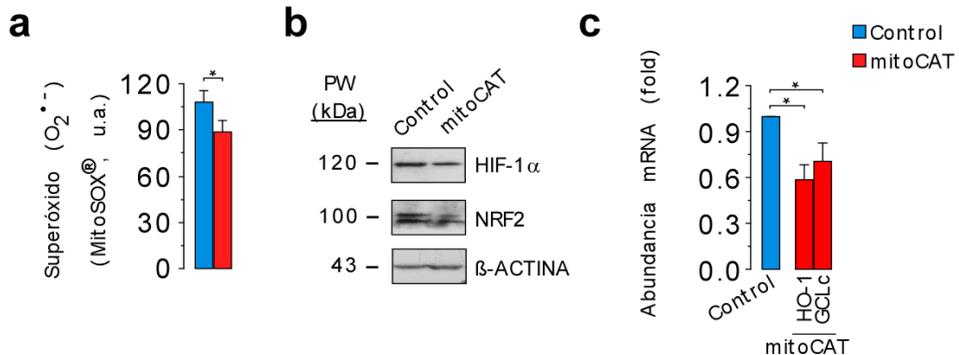


Figura 50. Los ROS en astrocitos ejercen un papel señalizador a través de NRF2 y HIF1 α

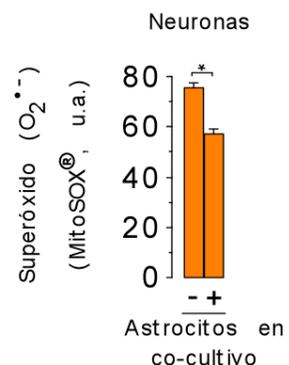
(a) Los niveles de $O_2^{\bullet-}$ se evaluaron en astrocitos tras la expresión de mitoCAT, y en la situación control (pIRESeGFP), mediante la sonda MitoSOX (u.a.). * $p < 0.05$ (t de Student's) ($n=2$) (b) Estimación de los niveles de NRF2 y HIF1 α tras la expresión de mitoCAT, mediante transferencia tipo Western. (c) Abundancia relativa de mRNA inducidos por NRF2 (*HO-1* y *GCLC*) tras la expresión de mitoCAT. Los niveles de expresión se encuentran normalizados (*fold*) respecto al gen control β -actina, y referenciados a la situación control (pIRESeGFP). * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) ($n=2$)

Mediante la reducción de los niveles de ROS en los astrocitos, gracias a la expresión de la catalasa mitocondrial, hemos podido observar como las ROS están ejerciendo un papel señalizador sobre la respuesta antioxidante y el metabolismo glucídico en los astrocitos.

Con la finalidad de valorar como afectan los ROS de los astrocitos sobre el funcionamiento neuronal, realizamos cocultivos de neuronas y astrocitos. En los cocultivos se evaluaron los niveles de $O_2^{\bullet-}$ en las neuronas en presencia o ausencia de astrocitos. Se observó como la presencia de los astrocitos era capaz de disminuir los niveles de $O_2^{\bullet-}$ en las neuronas (Figura 51).

Figura 51. La presencia de astrocitos disminuyó los niveles de $O_2^{\bullet-}$ en las neuronas

Los niveles de $O_2^{\bullet-}$ se determinaron en las neuronas en presencia y ausencia de astrocitos en cocultivo, mediante la sonda MitoSOX (u.a.). * $p < 0.05$ (t de Student's) ($n=3$)



Con la finalidad de estudiar la relación entre la producción de $O_2^{\bullet-}$ por los astrocitos y la observada en neuronas, se empleó el índice de correlación de Pearson (-0.49), observándose una relación inversa entre los niveles de $O_2^{\bullet-}$ en las neuronas y los

de los astrocitos. A mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ en los astrocitos, menor producción encontramos en las neuronas adyacentes (**Figura 52**).

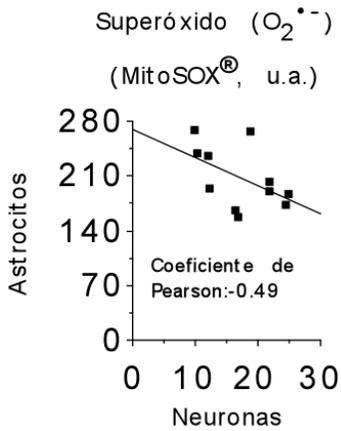


Figura 52. Existencia de una correlación negativa entre los niveles de $O_2^{\bullet-}$ en astrocitos y neuronas

La producción de $O_2^{\bullet-}$ se determinó en neuronas y astrocitos en cocultivo de manera individualizada, de forma que para cada pocillo de neuronas se valoró la producción en los astrocitos en cocultivo correspondientes. Se empleó el índice de correlación de Pearson, obteniéndose un coeficiente de -0.49, indicativo de una correlación negativa. (n=11)

Estos experimentos, aunque preliminares, evidencian un papel señalizador de las ROS en los astrocitos, puesto que no constituyen un agente dañino, ni para la propia funcionalidad del astrocito, ni para las neuronas que los rodean. De hecho, una disminución de los niveles de ROS en los astrocitos podría afectar al metabolismo glucídico (al modificar HIF1 α)⁴⁵ y las defensas antioxidantes (a través de NRF2), mermando la capacidad neuroprotectora del astrocito¹³². Este hecho quedaría reflejado en la correlación observada, al reducirse el $O_2^{\bullet-}$ en los astrocitos se incrementan los niveles en las neuronas.

5. DISCUSIÓN



Los astrocitos han sido considerados como las células antioxidantes del cerebro, gracias a la acumulación, y producción, de antioxidantes ^{129,130,132}. Esta descripción contrasta con las observaciones realizadas durante la elaboración de esta Tesis Doctoral, en la que se ha observado como los astrocitos producen ~3 veces más ROS que las neuronas. La diferente producción de ROS entre neuronas y astrocitos no es debida a un artefacto como consecuencia del cultivo de las células, puesto que ha sido corroborada mediante dos aproximaciones *ex vivo*, observándose en ambas como los astrocitos son más productores de ROS que las neuronas.

No obstante, ambas afirmaciones no resultan contradictorias, puesto que las ROS ejercen un papel señalizador en la propia defensa antioxidante, por ejemplo, mediante la activación transcripcional de NRF2 ³⁴. En trabajos previos de este laboratorio ¹³² se ha demostrado como los astrocitos, gracias a la activación de la vía NRF2 ejercen un papel neuroprotector sobre las neuronas, al incrementar la síntesis de glutatión, el principal sistema antioxidante en cerebro.

Asimismo, en esta Tesis se muestran experimentos preliminares en los que se observa como la reducción de ROS en astrocitos disminuye la expresión de NRF2 y HIF1 α , reguladores clave de la respuesta antioxidante y del metabolismo celular. Gracias a la utilización de este mismo abordaje (mitoCAT) en cultivos de fibroblastos, hemos podido demostrar la implicación de los ROS en el metabolismo glucídico ⁴⁵, mediante la regulación de HIF1 α . Este proceso, pensamos, podría estar ocurriendo en astrocitos, explicando la mayor actividad glucolítica de este tipo celular en relación a las neuronas ^{133,144}.

A nivel celular, tal y como se ha comentado, varias son las actividades enzimáticas encargadas de la producción de ROS. En esta Tesis, se ha descartado, ya sea mediante el empleo de inhibidores (alopurinol y VAS2870), o estrategias de reducción de la expresión proteica (sip22^{phox}) la implicación de la xantina oxidasa y las NADPH oxidasas en los altos niveles de producción de ROS observados en astrocitos. No obstante, no se han descartado fuentes adicionales, como por ejemplo la mGPDH o la α -ketoglutarato deshidrogenasa. Estas enzimas producen ROS en condiciones similares al complejo I mitocondrial (alta razón NADH/NAD⁺, isquemia/reperfusión y dependencia del potencial de membrana), por lo que esclarecer su contribución resulta complicado.

Lo que sí se ha podido corroborar es la implicación de la mitocondria. Gracias a la determinación de H₂O₂ en mitocondrias aisladas, y como consecuencia de la evaluación del O₂⁻ mitocondrial mediante la sonda Mitosox, hemos podido demostrar como a nivel mitocondrial las diferencias en la producción de ROS se mantenían, siendo este organelo la principal fuente de ROS en astrocitos.

Es por ello, por lo que se determinaron las actividades enzimáticas de los complejos mitocondriales. A nivel de los complejos II-III, IV y citrato sintasa no se observaron diferencias entre neuronas y astrocitos, tal y como ya había sido descrito ^{129,142}. No obstante, a nivel del complejo I en ratas Wistar se observó un incremento en la actividad del complejo de I de ~6 veces en astrocitos respecto a neuronas. Esta observación, que ya había sido realizada con anterioridad por Stewart *et al.* ¹⁴², nos invitó a pensar en una posible implicación del complejo I, debido a su diferente abundancia,

como la fuente de ROS en astrocitos. Sin embargo, el mecanismo debía ser especie-específico, puesto que en ratones esta diferencia no se observaba.

Dada la implicación del complejo III, y de la formación de supercomplejos, sobre la estabilidad del complejo I¹⁰⁰, quisimos esclarecer la contribución del factor de ensamblaje de supercomplejos SCAFI⁸³ sobre la actividad del complejo I. SCAFI favorece la formación de supercomplejos entre los complejos III-IV, incrementando la estabilidad del complejo III, y por consiguiente del complejo I. En ratas Wistar había sido descrita la presencia de la isoforma funcional de SCAFI, a diferencia de lo que ocurre en ratones C57Bl6. Es por ello por lo que determinamos la actividad de los complejos mitocondriales en cepas de ratón con expresión funcional de esta proteína. Se trata de los ratones CD-1 y CBA-J. En estas cepas no observamos diferencias en la actividad del complejo I entre neuronas y astrocitos, a excepción de un incremento en la actividad del complejo I en ratones CBA-J, que a pesar de ser significativo no alcanzó los niveles observados en ratas Wistar.

Por tanto, mediante el empleo de varias cepas de ratón y ratas Wistar, habíamos descartado la actividad específica del complejo I como uno de los factores involucrados en las diferencias en la producción de ROS en astrocitos. Sin embargo, en rata Wistar se ha observado un efecto, específico de especie, que hace que los astrocitos incrementen la actividad del complejo I respecto a las neuronas. Este proceso no ha sido esclarecido a lo largo de este trabajo, puesto que escapa de nuestro objetivo.

Mediante el empleo de los inhibidores de la cadena transportadora mitocondrial (antimicina A y rotenona), hemos podido observar una respuesta diferencial en neuronas y astrocitos hacia la inhibición del complejo I. Los astrocitos incrementan la producción de O₂⁻ en respuesta a rotenona de forma más moderada a lo observado en neuronas. Esta diferencia podía ser debida a la implicación del transporte reverso de electrones en la producción de ROS por el complejo I⁴.

Para descartar la implicación del transporte reverso de electrones se empleó el inhibidor del complejo II ácido 3-nitropropiónico, no observándose una disminución de la producción en astrocitos. Este resultado nos permitió descartar la contribución del transporte reverso sobre la producción de ROS en astrocitos. En el caso de neuronas, se observó un incremento en la producción, debido al efecto neurotóxico de este compuesto sobre este tipo celular, tal y como ya había sido reportado por Olsen *et al.*¹⁴³.

La mayor abundancia de complejo I desactivado en astrocitos, junto con la menor respiración a partir de sus sustratos evidenció una menor capacidad mitocondrial en este tipo celular. Estos resultados se encuentran en consonancia con trabajos previos en los que se ha descrito como las neuronas utilizan preferentemente la fosforilación oxidativa para la obtención de energía, mientras que los astrocitos emplean la glucólisis^{133,144}.

Por otro lado, la diferente capacidad mitocondrial nos sugirió un mayor acoplamiento de la cadena transportadora mitocondrial en neuronas. Es por ello por lo que analizamos la organización de la cadena transportadora mitocondrial en cultivos primarios de neuronas y astrocitos, observando como las neuronas presentan mayor

abundancia de supercomplejos del complejo I, tanto en ratones C57Bl6 como ratas Wistar. En cambio, los astrocitos acumulan mayores niveles de complejo I libre, asociado a un incremento en la producción de ROS. Por tanto, este trabajo demuestra, por primera vez mediante el empleo de un sistema celular, las evidencias realizadas por Maranzana *et al.*⁷⁷ acerca de la influencia de los supercomplejos sobre la producción de ROS.

Estos resultados concuerdan con la diferente tasa de respiración observada, puesto que las neuronas, gracias a la mayor abundancia de supercomplejos, pueden realizar una eficiente transferencia electrónica por la canalización de sustratos^{86,87}.

Además, hemos observado como en los astrocitos el complejo I libre presenta una reducción en la subunidad NDUFS1. Este resultado, aunque llamativo, se encuentra en consonancia con trabajos previos en los que se ha descrito, por una parte, como el complejo I puede realizar un reemplazamiento selectivo de subunidades⁷¹, lo que permitiría encontrar en la célula diferentes poblaciones de complejo I con diferente composición. Además, se ha observado como durante el envejecimiento se produce una variación en la abundancia relativa de las subunidades del módulo N, entre las que se encuentra NDUFS1, asociado a un incremento en la producción de ROS¹⁰⁶.

Es por ello por lo que evaluamos como la modulación de la abundancia de esta subunidad en cultivos primarios de neuronas y astrocitos afectaba al ensamblaje y la producción de ROS. Observamos, como tras su silenciamiento en cultivos de neuronas se reducía la abundancia de supercomplejos y se incrementaban los niveles de ROS. En el caso de astrocitos, la sobreexpresión de esta subunidad redujo la producción de ROS e incrementó la abundancia de supercomplejos. Además, se procedió a reducir los niveles de ROS en astrocitos mediante el empleo de antioxidantes (GSH-EE), afectando de esta forma a la abundancia de supercomplejos y a la producción de ROS por el complejo I.

Estos resultados evidenciaron la existencia de un ciclo de retroalimentación positiva entre la generación de ROS y la formación de supercomplejos, proceso ya propuesto por Genova y Lenaz¹³, constituyendo este trabajo la demostración de esta teoría.

En conclusión, este trabajo ha demostrado, en un sistema fisiológico, la relación existente entre la producción de ROS y la formación de supercomplejos, presentando ambos procesos una relación de retroalimentación positiva. Además, ha evidenciado como la producción de ROS en cerebro es un mecanismo regulado a nivel celular, ejerciendo un papel señalizador sobre el metabolismo y la respuesta antioxidante.

6. CONCLUSIONES



A la luz de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

1. Los astrocitos producen considerablemente más especies reactivas de oxígeno (ROS) que las neuronas, tanto en cultivo primario como *in vivo*. La principal fuente de estas ROS es el complejo I mitocondrial a través de la transferencia directa de electrones hacia el O₂. En astrocitos, el complejo I se encuentra en su forma desactiva en ~30%, a diferencia de lo que ocurre en neuronas, donde solo se encuentra ~5% del complejo I en la forma desactivada. La alta proporción de complejo I desactivado en astrocitos posiblemente explica su baja eficiencia mitocondrial para consumir O₂ a través de sustratos NADH, en comparación con neuronas.

2. En astrocitos, una alta proporción del complejo I se encuentra libre, mientras que en neuronas la mayor parte del complejo I se encuentra formando supercomplejos. Los niveles de la subunidad del complejo I NDUFS1 determinan la estabilidad del complejo y su ensamblaje en supercomplejos. Promoviendo el ensamblaje del complejo I en supercomplejos (mediante la sobreexpresión de NDUFS1) se reducen las ROS en astrocitos. Por el contrario, estimular el desensamblaje del complejo I de los supercomplejos (gracias al silenciamiento de NDUFS1) incrementa las ROS en neuronas. Por tanto, la modulación del ensamblaje de los supercomplejos controla la producción de ROS mitocondrial.

3. La reducción de los niveles de ROS en astrocitos promueve la estabilización del complejo I y su ensamblaje en supercomplejos, disminuyendo la producción de ROS a través del complejo I. Esto sugiere la existencia de un ciclo positivo de desestabilización del complejo I por ROS mitocondriales responsable de una mayor producción de ROS, en los astrocitos. Además, nuestros resultados preliminares sugieren como las ROS mitocondriales en astrocitos juegan un papel fisiológico en la señalización celular, posiblemente afectando a la función neuronal.

*7. RESUMEN
EN INGLÉS*



*Dado que esta memoria se presenta para la obtención del Título de Doctor Internacional,
se muestra un Resumen en Inglés.*

ABSTRACT

Understanding the physiological roles of reactive oxygen species (ROS) in the brain requires dissecting out the contribution of different neural cell types to ROS formation.

Here, the abilities of neurons and astrocytes to spontaneously generate ROS were characterized. We found that ROS production is higher (from 1.5- to 10-fold) in astrocytes than in neurons, as assessed in primary cultures prepared from Wistar rats and C57Bl6 mice, regardless of the culture medium conditions and methods of ROS assessment. Such difference in ROS production was confirmed in neurons and astrocytes acutely dissociated from adult C57Bl6 mice, strongly suggesting an *in vivo* phenomenon. Furthermore, higher ROS production was found to take place in mitochondria isolated from cultured astrocytes when compared with those isolated from neurons.

To understand the mechanism explaining this different mitochondrial ROS production, we focused on the assembly of the mitochondrial respiratory chain. Using blue-native gel electrophoresis, proteomic analysis, and Western blotting, we found that, in astrocytes, a large proportion of complex I occurs free, whereas in neurons most complex I is embedded into supercomplexes. Furthermore, the abundance of complex I subunit, NDUFS1, in free complex I, was found to be lower in astrocytes than in neurons. Over-expression of NDUFS1 in astrocytes increased the proportion of complex I into supercomplexes and decreased mitochondrial ROS production. Conversely, knockdown of NDUFS1 in neurons decreased the proportion of complex I into supercomplexes and increased mitochondrial ROS production.

We also found that, reduction of ROS abundance in astrocytes by incubation with GSH-ethyl ester stabilized complex I and promoted its assembly into supercomplexes.

Finally, reduction of mitochondrial ROS in astrocytes by the expression a mitochondrial-tagged form of catalase (mitoCatalase), decreased NRF2 activity and HIF1 α stability.

Altogether, these results are the first to demonstrate that the modulation of complex I assembly into supercomplexes regulates mitochondrial ROS production in an intact biological system. Moreover, this mechanism explains intrinsic differences in ROS production between neurons and astrocytes, likely playing different cell signalling physiological functions.

1. INTRODUCTION

For decades it has been extended the idea than ROS formation is the unwanted consequence of cellular metabolism. Because of that, ROS has been considered a sub product which is necessary to destroy. However, no clinical trial developed until the moment have demonstrated the efficacy of antioxidants therapies, at least in neurological

disorders ². Because of that, we need to understand the exact role of ROS. Maybe they are not a secondary product of metabolism, and develop important functions in cellular physiology. In this Doctoral Thesis we report data that –we believe– demonstrate like ROS formation is tightly controlled in brain. We think that this result is a clear evidence of physiological function of ROS.

1.1 ROS: fleeting signalling molecules

The word ROS clusters different molecules obtained by the acceptance of, at least, one electron, by oxygen, generating superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), which can form hydrogen peroxide (H_2O_2), and subsequently hydroxyl radical ($\cdot OH$). In biology exists different ways to produce ROS, mainly they are obtained like a product of enzymatic reactions.

The first step in ROS generation is $O_2^{\cdot-}$ production. In next sections we are going to describe the different mechanism that generate $O_2^{\cdot-}$.

H_2O_2 is generated by the reduction of $O_2^{\cdot-}$ by superoxide dismutase (SOD) ⁵, among other reactions, like during dopamine catabolism. H_2O_2 is a reactive specie, chemically unstable. In the presence of reduced metals (Fe^{2+} , Cu^+) generates $\cdot OH$ and $\cdot OH$ by Fenton or Haber Weiss reactions ⁶. However, H_2O_2 could be reduced to water by the activity of catalase, peroxiredoxins and glutathione peroxidases ⁷. For this enzymes exists different isoforms, allowing expression in cytosol and mitochondria.

1.1.1 ROS production sites

During NADH or NADPH oxidation, NOX (NADPH oxidases) generate H_2O_2 or $O_2^{\cdot-}$, depending on the NOX isoform (NOX1-5, Duox1-2) ¹⁶. Due to their localization, mainly in the plasmatic membrane, ROS production is released out the cell. However, NOX4 present in mitochondrial membrane, produces H_2O_2 inside the cells ¹⁶.

Xantine oxidase (XO), during hipoxantine conversion to xanthine, or xanthine in uric acid, produces H_2O_2 or $O_2^{\cdot-}$. Their production has been associated with ischaemic/reperfusion process, having a minimal contribution to ROS production in physiological situations ^{17,18}.

Dopamine catabolism is able to generate H_2O_2 thanks to the activity of monoamine oxidase during oxidative deamination of dopamine. Furthermore, oxidation of dopamine could produce $O_2^{\cdot-}$ and reactive products, like semiquinones, with oxidative capacity ^{19,20}.

Piruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase are metabolic enzymes with the ability to produce $O_2^{\cdot-}$ in high ratio NADH/NAD⁺ and during ischaemia reperfusion ^{21,22}.

The activity of mitochondrial electron transport chain, is not only responsible of ATP generation, their components have the ability to produce $O_2^{\cdot-}$ in different situations.

Mitochondrial complex I is the biggest complex of the chain. Is involved in NADH oxidation, giving electrons to ubiquinone. The redox process is coupled with H^+ transport across the membrane, contributing to $\Delta\Psi_m$ generation²³. Its structure and function will be deeply analysed in next sections of this document.

Complex I produces $O_2^{\cdot-}$ when NADH/NAD⁺ ratio is high, and in the presence of inhibitors that block ubiquinone binding site in the complex, like rotenone⁴. Also, complex I could generate $O_2^{\cdot-}$ during reverse electron transport, in which electrons come back from oxidized ubiquinone, and $\Delta\Psi_m$ is high, being their contribution minimal in physiological situations⁴.

Although complex II, mGPDH and ETF don't contribute to de membrane potential, they can transfer electrons to ubiquinone. During this process they can generate $O_2^{\cdot-}$ due to mutations, changed levels of substrates, defective protein-protein interactions, in a $\Delta\Psi_m$ dependent manner, among others²⁵⁻²⁸.

Complex III oxidizes ubiquinol to ubiquinone, coupling this redox reaction with the transport of 4 H^+ across the inner membrane²⁹. This complex, when their redox center is inhibit by antimycin A, can generate $O_2^{\cdot-}$ in both sides of the inner membrane. This process depends on the stability of semiquinones in the redox place of the complex, being affected by redox state of ubiquinone, cytochrome *c*, and $\Delta\Psi_m$ ^{4,30}.

1.1.2 ROS signalling

ROS signalling is mainly involved in antioxidant defences. However, they participate in other cellular signalling process, like control of vasculature, oxygen tension, and in the transduction process though cellular receptors⁶. Their signalling events mainly involve cysteine oxidation, exerted by H_2O_2 ³¹.

ROS production has been associated with the activation of NRF2 pathway, controlling the expression of antioxidant genes. In this signalling process, cystein oxidation in NRF2 sensor, KEAP1, allows the stabilization of NRF2 allowing its accumulation and nuclear translocation, starting antioxidant gene transcription³⁴.

$O_2^{\cdot-}$ production by complex III is related with HIF1 α stabilization, allowing metabolic reprogramming and cellular survival^{40,41}.

These are only two examples that show physiological functions for ROS. However, still remain a lot of questions unresolved in redox signalling, the answer would help in the treatment of different pathological conditions³⁸.

1.1.3 ROS and neurological diseases

During ageing brain accumulates oxidized proteins, lipids and nucleic acids, increasing during pathological conditions, like neurodegenerative illnesses.

In Alzheimer's or Parkinson's disease, has been found increased levels of ROS production, due to amyloid β accumulation, or mitochondrial dysfunction⁴³, accompanied by reduced levels of antioxidant defences^{2,42}. Sporadic Parkinson can be originated after inhibition of complex I by toxic substances like rotenone⁴⁴. Therefore, mitochondrial dysfunction and ROS production can be considered as a main factors allowing neurodegenerative disorders.

Nonetheless clinical trials with antioxidants haven't report beneficial effects in humans². This could be due to a reduced pharmacological efficiency of compounds in humans, among others differences with animal models. Other possibility is than exogenous antioxidants could be affecting endogenous processes, due to the role ROS in adaptation to tissue damage^{2,51,54}.

1.2 Complex I

Complex I is the entry point of electrons from NADH in mitochondrial electron transport chain. It's composed by 44 subunits, being 14 of them essential for complex I activity. Seven of its 44 subunits are encoded in mitochondrial DNA, being the others coded by nuclear DNA⁵⁶⁻⁵⁸. Complex I presents a FMN cofactor, the first acceptor of electrons, which transfer them among 7 Fe-S clusters to ubiquinone^{4,24}.

Complex I is located in the inner membrane, presenting a "L" shaped structure, with an hydrophilic arm, in which redox centres are located, and a hydrophobic part, where mitochondrial subunits are present, involved in H⁺ translocation^{57,59}. Recently complex I structure of core subunits has been determine for mammalian complex I⁵⁸.

FMN cofactor is situated in NDUFV1 subunit. Ubiquinone binding site is located within NDUFS2, NDUFS7, MTND1 and MTND3 subunits. Fe-S clusters are present in NDUFV2, NDUFS1 and NDUFS7-8 subunits²³.

How occurs proton translocation process in complex I, and how this process is coupled with electron transfer, are still open questions in complex I function²³.

1.2.1 Complex I: structure and assembly

Complex I assembly is a sequential process in which complex I forms subcomplexes with different molecular weight, being NADH oxidase subunits the last to be incorporated to the enzyme, reducing effects of oxidative stress^{56,59,65}.

Non-essential subunits of complex I have been associated with assembly process, like NDUFS4, NDUFS6, NDUFA2, NDUFA10 and NDUFA11⁶⁶. Furthermore, other proteins have been implicated in the assembly process, being assembly factors for complex I, like ECSIT, NDUFAF1-6⁶⁷, IND1⁷⁰, ACAD9⁶⁸, C3ORF1, FOXRED1 and TMEM126B⁶⁹. Protein absence of this assembly factors generates subcomplexes of complex I.

The assembly of complex I can happen by two different ways, *de novo*, or with a selective replacement of damaged subunits⁷¹.

We can find complex I in two catalytic and structural conformations, active (A) or deactive (D) ⁷². This different states of complex I could help cells in the adaptation to changes in cellular metabolism, reducing oxidative damage to the complex during ischaemic/reperfusion process, for example ⁷³. Deactive form of complex I can work as a Na^+/H^+ antiporter, maintaining membrane potential, despite their absence of redox activity ⁷².

1.2.2 ROS generation by complex I

Complex I mainly produces $\text{O}_2^{\cdot-}$ ^{55,74}, in two different points, FMN cofactor, and N2 Fe-S cluster.

FMN production could occur when flavin is completely reduced, transferring one electron to O_2 ⁴. This production depends on NADH/NAD⁺ ratio, and on the presence of inhibitors that block ubiquinone binding site of the complex ⁷⁴.

In the case of N2 cluster, it present high accessibility to O_2 , allowing electron transfer directly to it. Furthermore, production of $\text{O}_2^{\cdot-}$ by this point explain how inhibitors and quinone analogues increased ROS production by complex I ^{75,76}.

In physiological conditions, FMN contribution to $\text{O}_2^{\cdot-}$ production is lower, due to their reduced exposure as a consequence of supercomplexes formation by complex I ⁷⁷.

1.3 Supercomplexes

Mitochondrial electron transport chain organization could be explained according to different models, being plasticity model one capable to adapt mitochondria organization to cellular metabolism ⁸⁰.

According with plasticity model, electron transport complexes can form supercomplexes, between complex I, III and IV ⁸⁰. Complex V forms dimers responsible of cristae shape of inner mitochondrial membrane ⁸².

Supercomplexes have the ability to O_2 consumption ⁸⁰, integration of mobile carriers ^{80,83,84} and reduced production of $\text{O}_2^{\cdot-}$ by complex I ⁷⁷. These events report structural and functional benefits to cells, increasing complex stability ^{65,145}, optimizing electron transfer and substrate channelling, reducing diffusion distances for ubiquinone and cytochrome *c* ^{86,87}, and promoting efficient oxidation of different substrates ⁸³, reducing $\text{O}_2^{\cdot-}$ production ⁷⁷.

1.3.1 Factors involved in supercomplexes stability

Supercomplexes stability has been associated with lipid content, composition and shape of inner mitochondria and membrane potential ⁹⁰, and postraductional modifications that occurs to individual complexes. However the mechanism of some of them is still an open question ¹³.

Lipid content in inner mitochondria could stabilize supercomplexes, if phospholipid/protein ratio is high ⁸⁷. Cardiolipin is a structural component of complex III, IV and supercomplexes ⁸⁸. It increases supercomplexes stability due to the neutralization charge of lysines ⁹².

In the case of membrane potential, its direct role in ROS production by individual complexes can affect supercomplexes stability. When $\Delta\Psi_m$ is high ROS production is stimulated, decreasing supercomplexes and complex I stability ⁹³. However, the exact mechanism is still an open question.

1.3.2 Supercomplexes assembly

Supercomplexes assembly is still an unknown process. However, the common aspect among different theories ^{80,145} is that supercomplexes stimulates the stability of individual complexes ^{99,100}.

Different proteins have been associated with supercomplexes formation, like COX7RP ¹⁰¹, DNAJC15 ¹⁰², TMEM126B ⁶⁹, C11ORF83 ¹⁰⁴ and SCAFI ⁸³. Most of them affect supercomplexes formation through individual modification of complex activity or stability, despite SCAFI, which presence delimitates different pools of complex IV, allowing efficient oxidation of different substrates.

1.3.3 Supercomplexes and ROS production

Complex I increases its stability when forms part of supercomplexes, reducing O_2^- production ^{4,90}, as demonstrated Maranzana *et al.* ⁷⁷ by *in vitro* approaches.

Supercomplexes destabilization, as a consequence of oxidative stress, could originate a positive feedback increasing ROS production. In this situation, ROS production would increase as a consequence of reduced electron transfer efficiency, increased lipid peroxidation and complex I damage ¹³.

1.4 Cellular composition of brain

Brain is a complex organ with high metabolic demand ¹⁰⁸.

For the four main cell types in brain, neurons are electrically excitable cells that process and transmit information through electrical and chemical signals ¹¹⁰.

Astrocytes represent the most abundant population in brain ¹¹³. They develop functions of metabolic and structural support, for example, controlling blood flux, pH or K^+ levels ^{113,115–117,119}.

Oligodendrocytes create myelin sheath around axons, increasing impulse speed ¹¹⁷.

Microglia are the resident macrophages of the brain. They are involved in immunological surveillance, and develop important task during brain development, allowing the creation of proper neuronal circuits ^{112,125}.

Between all cell types exist an intrinsic collaboration. We are going to focus on neuronal and astrocytes coupling due to their abundance and important role in brain function ¹¹².

According to the lactate shuttle hypothesis, astrocytes take glucose and convert it into lactate, than send to neurons ¹²⁶. Neurons oxidize lactate via the tricarboxylic cycle to obtain ATP, that use for efficient neurotransmission.

One important neurotransmissor is glutamate. Astrocytes remove glutamate from the synaptic space, and transform it into glutamine. Glutamine is released and taking up by neurons, which convert it into glutamate, for their use as neutrotransmissor. This cycle is known as glutamate-glutamine cycle ¹²⁸.

Astrocytes also accumulate high levels of antioxidants, like catalase, vitamin E and NRF2 transcription factor, which controls the expression of antioxidant genes in response of ROS insults ^{129,131}. This allows the synthesis of glutathione, the main antioxidant in brain. Astrocytes send glutathione precursors to neurons. Because of this, astrocytes are known as the main antioxidant cells in brain.

2. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Reactive oxygen species play an important role in different physiological and pathological processes, especially in neurodegenerative disorders. Because of that, their production in brain should be highly controlled. Given their signalling role, it would not be surprising to note differences in ROS production related with physiological functions of neurological cells.

Thus, our hypothesis is that brain should have a regulated mechanism of ROS production able to sort out metabolic and physiological functions of brain cells.

In light of the antecedents described, and in accordance with our hypothesis, we have posed the following objectives:

1. To determine $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 production in neurons and astrocytes, identifying their ROS producing site and the mechanism of their regulation.
2. To establish the relationship between ROS production and metabolical and physiological role of different brain cells.

3. MATERIALS AND METHODS

Ethical use of animals. Wistar rats and C57Bl6, CD-1 and CBA-J mice were bred at the Animal Experimentation Unit of the University of Salamanca. All protocols were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca in accordance with the Spanish legislation (Law 6/2013).

Primary cell cultures and co-cultures. Primary cultures of rat or mouse cortical neurons were prepared¹³⁴ from fetal Wistar rats of 16.5 days of gestation, and 15.5 days in C57Bl6, CBA-J or CD-1 mice, seeded at $2.0 \cdot 10^5$ cells/cm² in different size plastic plates coated with poly-D-lysine (10 µg/ml) and incubated in Neurobasal (Life Technologies) supplemented with 2 mM of glutamine and 2% B27 supplement (Life Technologies). Cells were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂-containing atmosphere. At 72 hours after plating, the medium was replaced. Cells were used for the experiments on day 7 in vitro (DIV). Astrocytes in primary culture were obtained from 0-24 h old neonates, and cell suspension seeded at the ratio of 3-4 brains per 175 cm² plastic flask, in DMEM supplemented with 10% fetal serum. To detach non-astrocytic cells, after one week in vitro, the flasks were shaken at 180 rpm overnight. The supernatant was discarded, and the attached, astrocyte-enriched cells, were reseeded at $0.5 \cdot 10^5$ cells/cm² in different size plates. Astrocytes were used for the experiments on day 14 DIV. To obtain astrocyte-neuronal co-culture, astrocytes were re-seeded on 10 cm² inserts (0.4 µm pore size) in Neurobasal medium, and the inserts were co-cultured with 1 DIV neurons during 6 days.

Protein overexpression. To overexpress specific proteins we transfected cells using Lipofectamine LTX-PLUS Reagent (Life Technologies) according with manufacturer's protocol. Transfections were performed 24 hours before cell utilization. We overexpressed NDUFS1 protein using NDUFS1 plasmid (Origene) and pcDNA3.1(+) (Invitrogene) like a positive control. For this overexpression, cotransfection in a 9:1 relation were done with peGFPc1 plasmid, allowing the selection of GFP⁺ cells by flow cytometry. In the case of mitoCatalase overexpression, pIRES2eGFP (Clonthech) was used as a control.

RNA interference. To knockdown specific proteins, we used the following siRNAs: siNDUFS1 (s105592; Life Technologies), sip22^{phox} (s64648; Life Technologies). In all cases a siControl (4390843; Life Technologies) was used as a control. Transfections were done with Lipofectamine RNAiMAX reagent (Life Technologies) according with manufacturer's protocol; the final concentration of siRNAs was 9 nM. Cells were used after 3 days.

Cell treatments. Astrocytes were incubated with 5 mM GSH-EE during 24 hours prior cell recollection. Primary cultures of neurons and astrocytes were treated with 0.5 and 1 mM of 3NP during 1 hour before cell recollection.

Reactive oxygen species (ROS) measurements. Mitochondrial superoxide was detected using the fluorescent MitoSox probe (Life Technologies). Cells were incubated in HBSS with 2 µM MitoSox for 30 minutes at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, washed with PBS, and the fluorescence assessed by flow cytometry (in arbitrary units) or

fluorescence microscopy (trying to find colocalization with mitochondrial staining – 1/1000 Cytopainter Mitochondrial Staining Kit, Abcam-). To increase superoxide production, 10 μM of antimycin A or 10 μM of rotenone were added to the cells during 15 minutes. For H_2O_2 assessments AmplexRed (Life Technologies) was used. Cells were plated onto 96 wells plate, at 7 DIV for neurons, or 14 DIV for astrocytes, cells were washed with PBS and incubated in 9.45 μM AmplexRed KRP containing 0.1 U/ml of horseradish peroxidase. Luminescence was recorded for 2 h at 30 minutes intervals using a Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific) (excitation 538 nm; emission 604 nm). Slopes were used for calculations. VAS2870 or allopurinol (1, 5, 10, 50, 100 μM) were added to the mixture in some experiments. H_2O_2 was measured in isolated mitochondria, using 5 μg of proteins- aliquots of freshly-obtained mitochondria, and using the same protocol as we describe for intact cells. The determination of H_2O_2 directly from gel slices were done adding to the reaction buffer 20 μM of NADH and 40 U/ml of SOD.

Mitochondrial Membrane Potential. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) was assessed using the probe DiIC1(5) (Life Technologies) (50 nM) by flow cytometry. For this purpose, cells were incubated with the dye at 37 °C for 30 minutes. $\Delta\Psi\text{m}$ values were expressed in arbitrary units. CCCP (10 μM) was added to cells (for 15 minutes) to define the depolarized value. Mitochondrial depolarization was also assessed using 10 μM antimycin A or rotenone (15 minutes).

In vivo experiments. Brain dissociation was done enzymatically and mechanically ¹³⁵. Cells were stained with Integrin- β 5 antibody (1/500)(14-0497, eBioscience), to identify astrocytes ¹⁴⁰, and superoxide and mitochondrial membrane potential was measured in Integrin- β 5 positive and negative cells by flow cytometry. Adenovirus expressing GFP under astrocytic (left) or neuronal (right) promoter were injected stereotaxically. The injections were done in mice 9 weeks old, with 3 μl in the somatosensory cortex (AP: -0.7 mm; L: +/- 3mm; V: -0.6 mm). Animals were used after 12 weeks old. The brain was extracted, hemispheres separated, and the fluorescent areas were punched under the microscope. Cells were separated using Neuronal Tissue Dissociation Kit (P) (Miltenyi, Germany). After excision, MitoSox staining was done. Superoxide production was evaluated in GFP⁺ cells by flow cytometry.

Immunohistochemistry. After deep anesthesia, mice were perfused intraaortically with 0.9% NaCl, followed by 4% (w/v) paraformaldehyde, 0.2% (w/v) picric acid in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Brains were dissected and post fixed overnight and cryoprotected before 20 μm thick coronal sections were obtained with a freezing – sliding cryostat. Sections were stained with anti-NeuN and anti-GFAP antibodies (overnight, 4°C, in presence of phosphate buffer 0.1 M). Secondary antibodies were incubated 2 hours at room temperature in phosphate buffer 0.1 M, followed by DAPI staining (10 minutes at room temperature, 1/7000).

Protein determinations. Protein samples were quantified by the BCA protein assay kit (Thermo) following the manufacturer's instructions, using bovine serum albumin as standard.

Activity of mitochondrial complexes. Cells were collected and suspended in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). After freeze/thawing three times to ensure cellular disruption, complex I, complex II-III, complex IV, and citrate synthase activities were determined as previously described¹²⁹. The activity of complex II was determined according to Lapuente-Brun *et al.*⁸³ protocol. Deactive complex I was determined after NEM treatment of cell homogenates (10 μ M, 15 minutes, 15°C). The activity in this conditions corresponded only with active form of complex I.

Mitochondria isolation and solubilization. Mitochondria were obtained according to Acín-Pérez *et al.*⁸⁰. When high purity mitochondria were needed, they were obtained according to Starkov *et al.*¹³⁶. Solubilization of mitochondria was performed with digitonin at 4g/g according to Acín-Pérez *et al.*⁸⁰.

Mitochondrial respiration. Oxygen consumption (Clark electrode, Rank Brothers) was measured from neuronal and astrocytic mitochondria in the presence of 5 mM of pyruvate/malate plus 1 mM ADP.

Cellular Lysis. Cells were lysed in RIPA buffer (1% SDS, 2 mM EDTA, 12.5 mM Na₂HPO₄, 1% TritonX-100 and 150 mM NaCl pH 7), supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma), and 100 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride and phosphatase inhibitors (1 mM o-vanadate) and boiled for 5 min.

Western blotting. Aliquots of lysates (50 μ g protein, unless otherwise stated) were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) electrophoresis on a 8, 10 or 12% acrylamide gel (MiniProtean, Bio-Rad) including PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo). The resolved proteins were transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes (Amersham protran premium 0.45 nitrocellulose, Amersham). Membranes were blocked with 5% (w/v) low-fat milk in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.1% (w/v) Tween 20, pH 7.5, for 1 h. After blocking, membranes were immunoblotted with primary antibodies overnight at 4°C. After incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnologies), goat anti-mouse IgG (Sigma and BioRad), mouse anti-rabbit IgG (Sigma), or rabbit anti-goat IgG (Abcam) (all at 1/10000 dilution, except goat anti-rabbit 1/4000 and mouse anti-rabbit 1/5000), membranes were immediately incubated with the enhanced chemiluminescence kit WesternBright ECL (Advansta), before exposure to Fuji Medical X-Ray film (Fujifilm), and the autoradiograms scanned. Biologically independent replicates were performed, and a representative Western blot is shown, together with densitometric analysis (ImageJ).

BNGE, In Gel activity of complex I and 2D. For the assessment of complex I organization, solubilized mitochondria (10-50 μ g) were loaded in a Blue Native Gel Electrophoresis (BNGE)¹³⁷, using NativePAGE Novex 3-12% Gels (Life Technologies). After electrophoresis, the activity of complex I was evaluated using in gel activity for complex I¹³⁷. After the identification of complex I and complex I forming part of supercomplexes, 2D electrophoresis was performed. The region containing complex I or complex I-supercomplexes was denatured in a denaturalizing solution (1% SDS, 1 % β -mercaptoethanol) during 1 hour. Gel slices were separated in a denaturing electrophoresis, followed by Western blotting and NDUFV1, NDUFS1 detection. Direct

transfer of BNGE was performed after soaking gels 20 minutes (4°C) in carbonate buffer (10 mM NaHCO₃; 3 mM Na₂CO₃·10H₂O; pH 9.5-10). Proteins transfer to nitrocellulose membranes was carried out at 300 mA, 60 V, 1 hour at 4°C in carbonate buffer

Primary antibodies for Western blotting. Immunoblotting was performed with anti-NDUFS1 (1/500) (sc-50132, Santa Cruz Biotechnology), anti-NDUFV1 (1/500) (AV48312, Sigma), anti-NDUFB8 (1/1000) (ab110242, Abcam), anti-UQCRC2 (1/500) (A-11143, Molecular Probes), anti-p22^{phox} (1/500) (sc-20781, Santa Cruz Biotechnologies), anti-NRF2 (1/500) (Santa Cruz Biotechnologies), anti-HIF1α (1/200) (ab65970, Abcam), anti-β-actin (1/30000) (A5441, Sigma).

Electroelution of proteins. After BNGE+IGA for complex I, bands of complex I and complex I-supercomplexes were excised and proteins were electroeluted. To electroelute proteins, gel slices were deposited in an electro dialysis membrane (Dialysis Tubing-Visking, Medical International), and an electric field was apply during 4 h a 100 V. Sample was recollected and the activity of complex I evaluated.

Mass spectrometry. Mass spectrometry analysis was carried out for complex I supercomplexes, complex I free and interbands at the Mass spectrometry service of MRC Mitochondrial Biology Unit (Cambridge). Fragments we excised and using standard in-gel digestion protocols. The digested peptides were extracted with 2 successive aliquots of 15ul (60% acetonitrilie, 4% formic acid) solution - the extracted solutions were pooled. A 15ul potion of the pool was dried to completion in a Speed-Vac instrument, and resuspended in a solution of 0.1% formic acid. These samples were then processed with an LTQ OrbiTrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher) following chromatography on a nanoscale reverse-phase column (75 μm inner diameter, 100 mm length nanoseparation) with a gradient of 0-40% buffer B (95% acetonitrile, 0.1% formic acid) in buffer A (5% acetonitrile, 0.1% formic acid) over 84 minutes at 300 nL/min. The chromatography was delivered with a Proxeon 'Easy-nLC' instrument. The spectrometer was programmed to perform a 'duty-cycle' comprising an initial low-resolution peptide mass survey in the Linear Ion Trap, followed by a concurrent set of two analyses: i) a high-resolution peptide mass survey scan performed in the Orbitrap analyser and ii) a series of peptide isolation and fragmentation events in the spectrometer's collision cell targetted to, at most, the 10 highest intensity peptides eluting from the chromatography. Individual peptide species were allowed a maximum of 2 successive fragmentation analyses before being excluded from further analyses. Assigment of peptide sequences to peptide fragmentation spectra, and subsequent grouping to identify proteins, was performed using Proteome Discoverer software (Thermo Scientific) configured to submit such spectra to the Mascot protein identification program (Matrix Science). Mascot was configured to use the *Mus musculus* subset of the Uniprot database current in December 2013. The following search parameters were used: enzyme specificity was defined as trypsin, and the possibility of the presence of modified methionine residues (through oxidation) and modified cysteine residues (through adduction of unpolymerised gel acrylamide monomers) was included in mass analysis. Following spectrum-to-peptide-sequence assignment, individual peptide relative intensities were quantified by Proteome Discoverer using the workflow components 'Event Detection' and 'Precursor Ions Area Detection'. Having quantified the peptides in a relative fashion, these components then made estimates of protein relative

intensities by grouping the peptides derived from the proteins and choosing, where possible, the three most intense peptide relative intensities to form a representative mean value. (When fewer than three peptides were available, the number of peptides actually available were used to form the representative mean value). In this manner, computed relative intensities of a particular protein in different slices of the gel could be compared in a meaningful way, removing to a fair degree the problem of the differential ionisation components of peptide ion intensity). From the different positions, the area were normalized to the maximum value making possible to cluster proteins and have information about the intensity of each proteins along the gel.

RT-qPCR. This was performed in total RNA samples, purified from astrocytes or neurons using GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma), following manufacturer's protocol, utilizing the Power SYBR Green RNA-to-CT 1-Step kit (Applied Biosystems). Primers and conditions are summarized in **Table 7**. The mRNA abundance of each transcript was normalized to the *β-actin* mRNA abundance obtained in the same sample. The resulting normalized values in astrocytes were expressed as the fold change compared with the corresponding normalized values in neurons.

Table 7. Primers and conditions in RT-qPCR

| mRNA | Direct (5'-3') | Reverse (5'-3') | Concentration | Temperature |
|---------------------------|-----------------------|----------------------|---------------|-------------|
| <i>Nox1</i> | CTGTAGGCGCCCTAAGTTTG | AAACCGGAGGATCCTTTTAC | 0.1 μM | 58 °C |
| <i>Nox2</i> | ATGCAGGAAGGAACAATGC | GTGCACAGCAAAGTGATTGG | 0.1 μM | 58 °C |
| <i>Nox3</i> | ACAAATGCAGTGAGGCACAG | CCGTGTTCCAGGGAGAGTA | 0.1 μM | 58 °C |
| <i>Nox4</i> | TGCAGAGATATCCAGTCTTCC | TCCCATCTGTTTGACTGAGG | 0.1 μM | 58 °C |
| <i>Duox1</i> | CTGACCCACCACCTCTACATC | CAGGAAGAAGATGTGGAACG | 0.1 μM | 58 °C |
| <i>Duox2</i> | TGAGAATGGCTTCTCTCCA | TCCCGAACATAGACTCCAC | 0.1 μM | 58 °C |
| <i>p22^{phox}</i> | CTGGCCTGATTCTCATCACT | GGGATACTCCAGCAGACAGA | 0.1 μM | 58 °C |
| <i>GCLc</i> | GGCACAAGGACGTGCTCAAGT | TTTGTCTCTCCCCCTTCTC | 0.3 μM | 50 °C |
| <i>HO-1</i> | AGCACAGGGTGACAGAAGAG | GAGGGACTCTGGTCTTTGTG | 0.4 μM | 50 °C |
| <i>β-actina</i> | AGAGTCATGAGCTGCCTGAC | CAACGTCACACTTCATGATG | 0.4 μM | 58 °C |

Statistical analysis. All measurements were carried out at least in two different culture preparations or animals, and the results were expressed as the mean values ± SEM. For the comparisons between two groups of values, the statistical analysis of the results was performed by the Student's *t* test. For multiple values comparisons, we used one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. The statistical analysis was performed using the SPSS software. In all cases, $p < 0.05$ was considered significant.

4. RESULTS

4.1 Astrocytes produce high levels of ROS, and its origin is mitochondrial

Assessment of ROS production in resting conditions was developed in primary astrocytes and neuronal cultures from C57Bl6 mice and Wistar rats in order to determine a possible species-specific effect. H₂O₂ production was evaluated by AmplexRed in intact cells at 7 DIV for neurons, and 14 DIV for astrocytes in standard medium. The results showed up to 10 folds high levels of H₂O₂ production in astrocytes (**Figure 53a**) in both

species. In order to assess the influence of medium in H_2O_2 production, astrocyte's medium was changed 24 h before determination to Neurobasal with antioxidants (Neurobasal AO), the same medium used for neuronal cultures. In this conditions, H_2O_2 production was still higher in astrocytes than neurons, in the same order or magnitude. Neurobasal medium has a B27 supplement with high content of antioxidants that could be influencing ROS production in cells. Because of this, astrocytes and neuronal medium was changed to Neurobasal plus B27 minus antioxidants (MAO), in this case, astrocytes still have increased production. Appears than medium is not responsible for the different H_2O_2 production between neurons and astrocytes, being astrocytes the cells with high levels. To determine its origin, we isolate mitochondria and measure the H_2O_2 production. Astrocytes present increased levels than neurons, so the origin of ROS production was mitochondria.

Like H_2O_2 is a derivate of $O_2^{\cdot-}$, we determined this metabolite using Mitosox by flow cytometry, this allows us to know the mitochondrial origin of $O_2^{\cdot-}$. In this determination (**Figure 53b**), we showed high levels of mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ in astrocytes. By microscopy we corroborated the mitochondrial localization of Mitosox probe.

To ensure that these differences were not due to a culture artefact, we developed two *in vivo* strategies. First strategy was based in the isolation of brain cells from adult mice, and the staining of them with Integrin- $\beta 5$ antibody, specific for astrocytes¹⁴⁰. Mitosox staining was done in Integrin- $\beta 5^{+/}$ cells. The analysis of Mitosox by flow cytometry showed high levels of $O_2^{\cdot-}$ in Integrin- $\beta 5^+$ cells (**Figure 53c**). The second approach was based in the used of stereotaxicall injections of adenovirus expressing GFP under specific promotor for neurons and astrocytes. Each AAV was injected in one hemisphere. We corroborated GFP expression in selected cells by immunohistochemistry. Mitosox staining of GFP⁺ cell revealed that astrocytes have high levels of $O_2^{\cdot-}$ than neurons (**Figure 53d**). These two strategies demonstrated than astrocytes are higher producers of ROS in brain.

Thus, astrocytes, independently of their specie or culture conditions, and *in vivo* situations, produce high levels of ROS than neurons. Furthermore, the origin of ROS was mitochondrial.

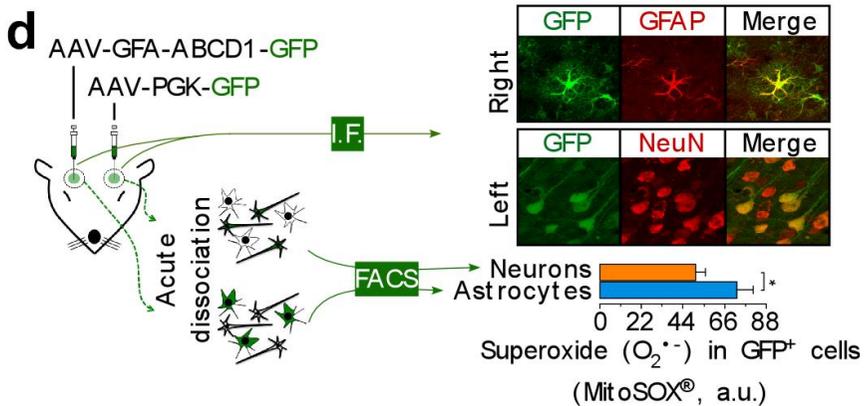
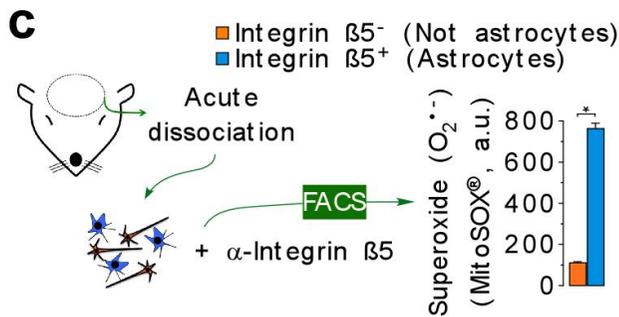
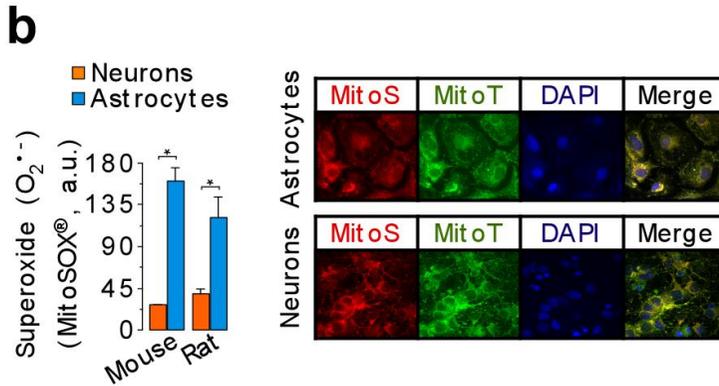
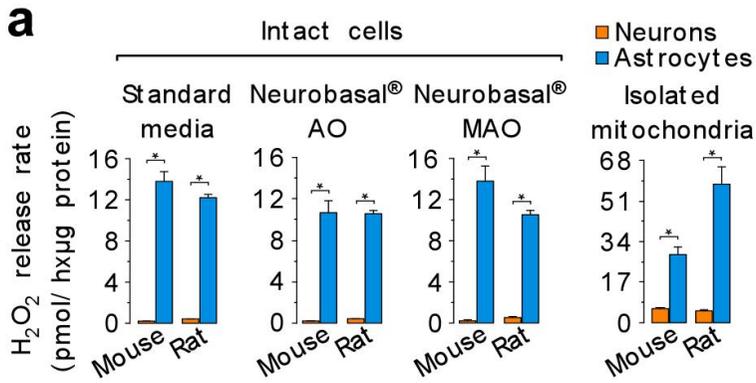


Figure 53. ROS production is higher in astrocytes

(a) Production of H_2O_2 in primary cultures of neurons and astrocytes in different mediums, and isolated mitochondria, determined by AmplexRed. * $p < 0.05$ (Student's t test) **(b)** $\text{O}_2^{\cdot-}$ levels in primary culture of neurons and astrocytes, using Mitosox * $p < 0.05$ (Student's t test) ($n=3$). Localization of Mitosox staining by immunocytochemistry with a mitochondrial probe (Cytosinker Mitochondrial Staining Kit, Abcam) in neuronal and astrocytic cultures. **(c)** $\text{O}_2^{\cdot-}$ levels after acute brain dissociation, and Integrin- $\beta 5$ staining, in Integrin- $\beta 5^{+/-}$ cells. * $p < 0.05$ (Student's t test) ($n=3$) **(d)** $\text{O}_2^{\cdot-}$ levels in GFP $^+$ cells after stereotaxical injections of AAV, expressing GFP under neuronal or astrocytic promoter in different hemispheres. GFP expression was corroborated by immunohistochemistry with NeuN and GFAP antibodies. * $p < 0.05$ (Student's t test) ($n=8$)

4.2 NOX and XO activities are not responsible of ROS differences between neurons and astrocytes, being mitochondrial complex I a plausible candidate

In order to assess the implication of alternative non mitochondrial sources of ROS in astrocytes (C57Bl6), we determine H_2O_2 production in the presence of allopurinol (1, 5, 10, 50 and 100 μM), a specific inhibitor of XO. In this conditions (**Figure 54a**) astrocytes showed no modification of H_2O_2 production. This prompted us to discard XO activity like a ROS source in astrocytes.

Moreover, we analysed NOX isoform expression in neurons and astrocytes by RT-qPCR. Astrocytes showed high levels of *NOX1*, *2* and *4*, having neurons increased expression of *NOX3* and *Duox1-2* (**Figure 54b**). We wanted to discard NOX contribution in astrocytes, because of their increased expression, treating cells with VAS2870 (1, 5, 10, 50 and 100 μM), a specific inhibitor of NOX, observing not effect of this inhibitor in ROS production (**Figure 54c**) in astrocytes. Like chemical inhibitors could have secondary targets in cells, we developed an alternative assay for the evaluation of NOX contribution. We silenced p22^{phox}, an essential subunit of NOX1, 2 and 4¹⁶, mainly isoforms in astrocytes. p22^{phox} knockdown was confirmed by Western blot and RT-qPCR. In this condition, astrocytes did not reduce H_2O_2 production.

Because of that, we can exclude XO and NOX activities as a source of the high levels of ROS in astrocytes.

We observed high levels of H_2O_2 and $\text{O}_2^{\cdot-}$ in mitochondria, however, Mitosox signal is dependent of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$), it is therefore we examined it. We analysed $\Delta\Psi\text{m}$ in Integrin- $\beta 5^{+/-}$ cells, observing high levels in cells corresponding to astrocytes (**Figure 54e**). In order to discard differences in $\text{O}_2^{\cdot-}$ levels, measured by Mitosox, as a consequence of $\Delta\Psi\text{m}$, we treated cells with antimycin A, decreasing $\Delta\Psi\text{m}$, and stimulating $\text{O}_2^{\cdot-}$ levels, in neurons and astrocytes from C57Bl6 mice and Wistar rats (**Figure 54f**). Moreover, we analysed $\Delta\Psi\text{m}$ and mitochondrial $\text{O}_2^{\cdot-}$ (in C57Bl6 cultures) after rotenone treatment. In this situation (**Figure 54g**) cells decreased their $\Delta\Psi\text{m}$ and increased $\text{O}_2^{\cdot-}$ levels.

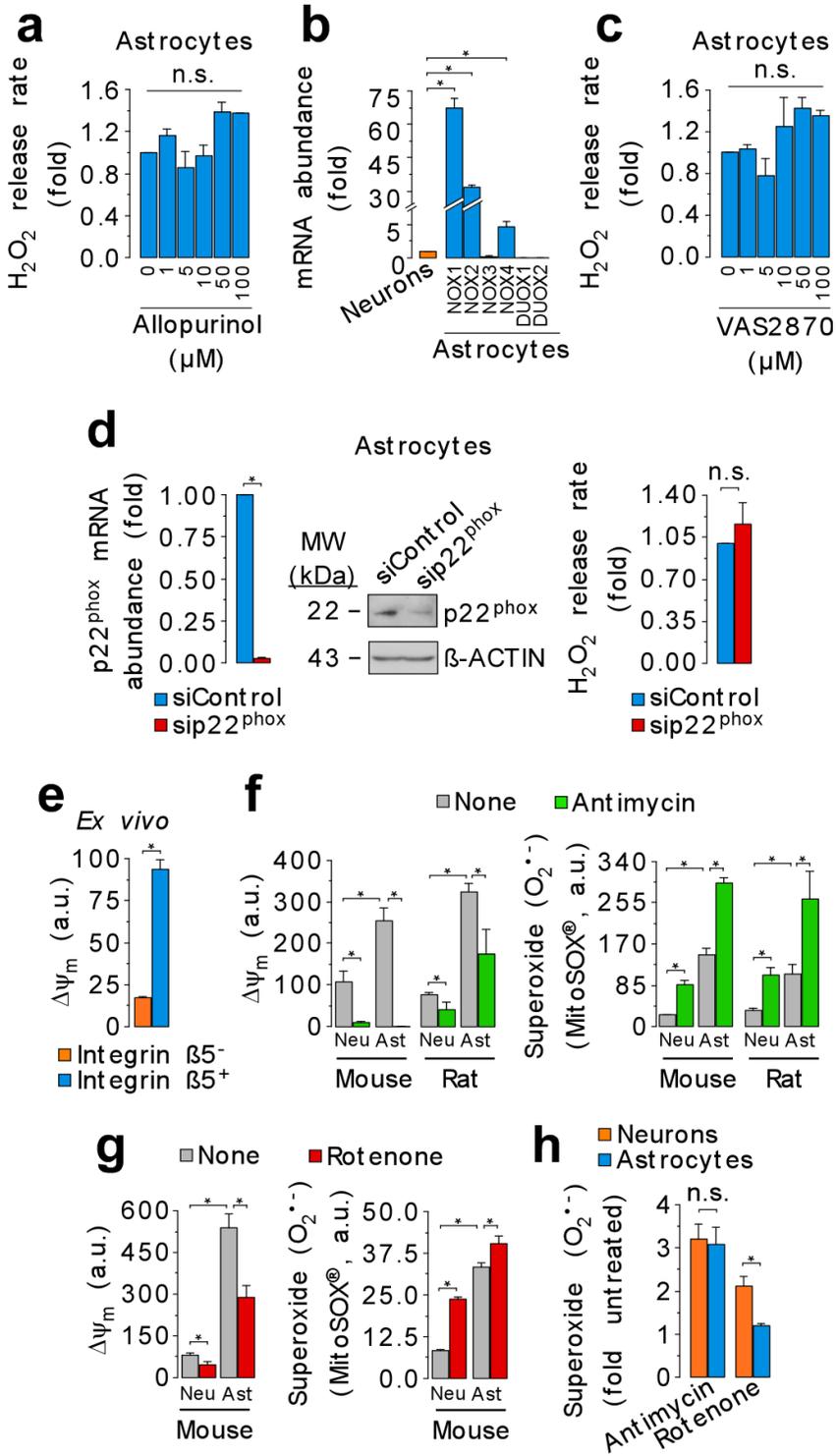


Figure 54. XO and NOX are not involved in high levels of ROS production in astrocytes. Evaluation of the effect of mitochondrial complexes inhibitors in $\Delta\Psi_m$ and $O_2^{\cdot-}$

(a) Effect of allopurinol in H_2O_2 production in primary cultures of astrocytes. Values are normalized (fold) to control situation. n.s. (not significative) $p > 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=2) **(b)** mRNA abundance of NOX isoforms in astrocytes regarding expression in neurons (fold). * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=3) **(c)** Effect of VAS2870 in H_2O_2 production in primary cultures of astrocytes. Values are normalized (fold) to control situation. n.s. $p > 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=2) **(d)** mRNA abundance of p22^{phox} after it knockdown by siRNA (fold vs siControl) in astrocytes. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=2). Western blot analysis of p22^{phox} after it knockdown by siRNA, using β -actin as a loading control. Effect of sip22^{phox} in H_2O_2 production in primary cultures of astrocytes. Values are normalized (fold) to siControl situation. n.s. $p > 0.05$ (Student's *t* test) (n=2) **(e)** $\Delta\Psi_m$ after acute brain dissociation, and Integrin- $\beta 5$ staining, in Integrin- $\beta 5^{+/-}$ cells. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=3) **(f)** $\Delta\Psi_m$ in primary cultures of neurons and astrocytes from Wistar rats and C57Bl6 mice, untreated and after antimycin A treatment. $O_2^{\cdot-}$ levels in primary cultures of neurons and astrocytes from Wistar rats and C57Bl6 mice, untreated and after antimycin A treatment. * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=3) **(g)** $\Delta\Psi_m$ in primary cultures of neurons and astrocytes from C57Bl6 mice, untreated and after rotenone treatment. $O_2^{\cdot-}$ levels in primary cultures of astrocytes from C57Bl6 mice, untreated and after rotenone treatment. * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=3) **(h)** $O_2^{\cdot-}$ stimulation (fold vs untreated) after antimycin A or rotenone treatment, in primary cultures of C57Bl6 mice. * $p < 0.05$; n.s. $p > 0.05$ (Student's *t* test)

Thus, astrocytes have high levels of $\Delta\Psi_m$, but $O_2^{\cdot-}$ production didn't appear to be related with $\Delta\Psi_m$, because if we depolarize mitochondria (with antimycin A or rotenone) we stimulate ROS production. These experiments show that the high level of $\Delta\Psi_m$ in astrocytes is not directly responsible of the elevated production of ROS in these cells.

With rotenone and antimycin A treatments, we have seen different pattern of ROS stimulation in neurons and astrocytes (**Figure 54h**). Antimycin A increased $O_2^{\cdot-}$ levels as the same extend in neurons and astrocytes. Notwithstanding, rotenone has different effect in both types of cells, presenting reduced influence in astrocytes. This prompted us to think in an increased $O_2^{\cdot-}$ production by complex I in astrocytes in resting conditions, because their inhibition is not able to increase $O_2^{\cdot-}$ in the same extend as neurons.

4.3 Mitochondrial complexes activities are not responsible of the differences in ROS production

Like complex I seemed to be the source of ROS in astrocytes, we wanted to know if ROS production was a consequence of different activity of the complex between neurons and astrocytes. Because of that, we have examined the activity of mitochondrial complexes in neurons and astrocytes in Wistar rats and C57Bl6 mice, in different cell culture mediums.

For C57Bl6 mice we did not observe differences in the activity of mitochondrial complexes. In Wistar rats, however, complexes I activity was ~ 7 fold higher in astrocytes than neurons. We also observed a significative difference between neurons and astrocytes

in Neurobasal-AO medium in complex II-III. Recently, Lapuente-Brun *et al.*⁸³ described a factor called SCAFI, implicated in the assembly of mitochondrial complexes involving complex III and IV, that was present in Wistar rats, but not in C57Bl6. This aimed us to think that maybe this factor was implicated in the high activity of complex I in Wistar's astrocytes, because complex I stability increases in the presence of stable complex III^{93,96}. To explore this possibility, we measured the activity of mitochondrial complexes in two other strains of mice who keep functional SCAFI, CD-1 and CBA-J. We observed a tightly increase in the activity of complex I in CBA-J (~1.5), not comparable with those observed in Wistar rats. We can also reject as SCAFI factor being responsible of differences in complex I activity between neurons and astrocytes in Wistar rats (**Figure 55**).

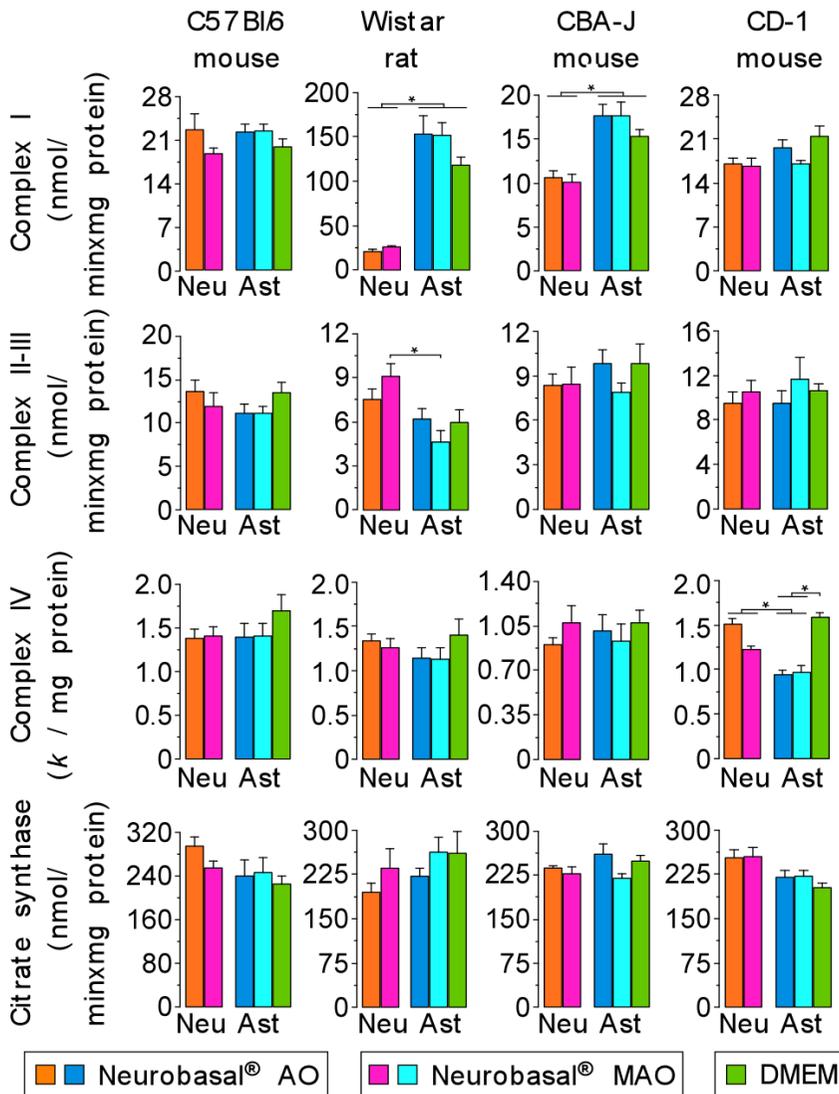


Figure 55. Specific activity of mitochondrial complexes

The specific activity of mitochondrial complexes I, II-III, IV and citrate synthase, was determined in primary cultures of neurons and astrocytes from Wistar rats and C57Bl6, CD-1 and CBA-J mice, in different culture conditions.

Because of that, we can conclude that the specific activity of mitochondrial complexes is not responsible of differences in ROS production between neurons and astrocytes, as they present, mainly, the same activity for mitochondrial complexes, even in different culture conditions.

4.4 Complex I in astrocytes occurs highly deactivated, reducing O₂ consumption

Like rotenone presented different effect stimulating ROS production in neurons and astrocytes, we wanted to know if this could be due to an inhibition of reverse electron transport, reducing O₂⁻ production by complex I.

To explore this possibility we treated C57Bl6 cells with 3NP. We observed an inhibition of complex II without affecting citrate synthase (**Figure 56a**). In this conditions, neurons increased their production of O₂⁻ (**Figure 56b**), possible due to a collateral effect of 3NP mediated by NMDA receptor activation and Ca²⁺ influx¹⁴³. In astrocytes, 3NP did not have any effect. Because of that we rejected reverse electron transport like a source of ROS in astrocytes.

Due to the presence of high levels of ROS in astrocytes we wanted to know if this could be affecting complex I function. To ascertain this we determined complex I deactivate form after inhibit A/D transition with NEM. We observed a reduced activity of complex I in astrocytes in presence of NEM, corresponding with increased presence of complex I deactive in astrocytes (**Figure 56c**).

Like complex I was highly deactivated in astrocytes, we wanted to know how was O₂ consumption through complex I in neurons and astrocytes. We observed reduced respiration rate by complex I substrates in astrocytes (**Figure 56d**).

Thus, astrocytes, possibly as a consequence of their high rate of ROS production, accumulate complex I in its deactive catalytic configuration, reducing O₂ consumption driven by complex I substrates.

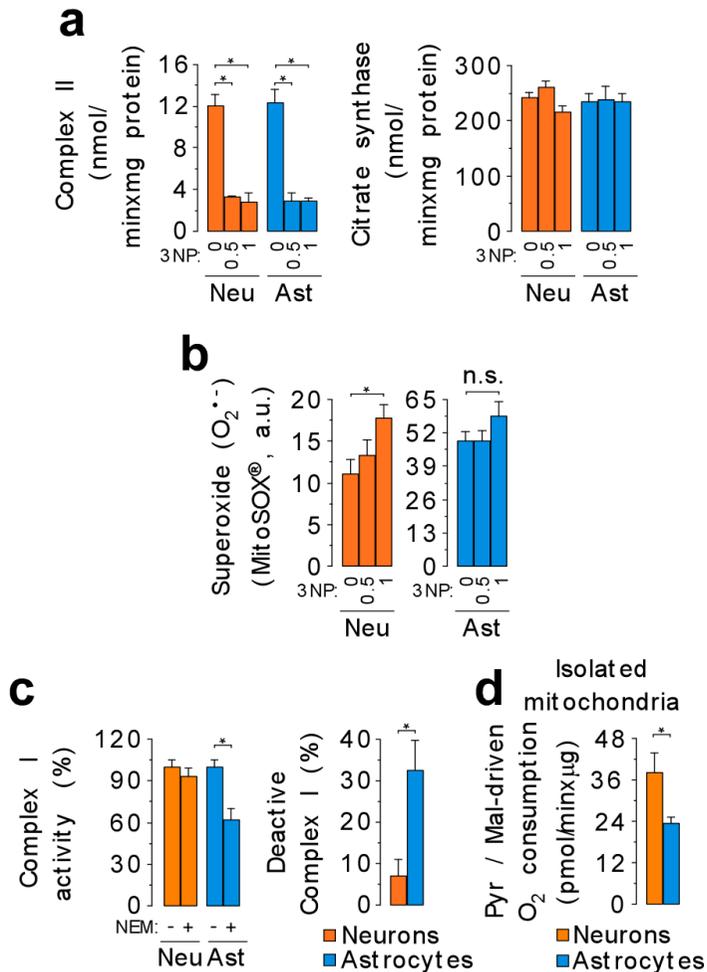


Figure 56. Effect of 3NP treatment in O₂⁻ production. Complex I is highly deactivated in astrocytes, reducing O₂ consumption

(a) Complex II and citrate synthase activity after cell treatment with 3NP (0.5, 1 mM 1 hour). * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=3) **(b)** O₂⁻ levels after cell treatment with 3NP. * $p < 0.05$ n.s. $p > 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=3) **(c)** Complex I activity (%) in the presence/absence of NEM (10 µM 15 minutes 15°C). % of Complex I in its deactive form. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=3) **(d)** Mitochondrial pyruvate/malate-driven O₂ consumption. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=2)

4.5 Assembly and composition of complex I is different in neurons and astrocytes

The activity of mitochondrial complexes is not the only responsible of ROS production, assembly of them into supercomplexes can affect the production of ROS^{77,146,147}. It is therefore we developed blue native gel electrophoresis (BNGE) followed by in gel activity (IGA) for complex I. In **Figure 57a** we can observed the different bands

corresponding a complex I and supercomplexes. In this image (**Figure 57a**) it's possible to appreciate the presence of supercomplex dependent of functional SCAFI (I+III₂+IV) in astrocytes from Wistar rats and CD-1 or CBA-J mice. To ensure that the bands were due to the presence of complex I we developed a 2D electrophoresis followed by NDFUV1 detection, corroborating the presence of complex I.

By direct transfer of BNGE we also corroborated the presence of complex III in supercomplexes bands (**Figure 57b**). With this analysis we observed high levels of complex I, and also complex III, into supercomplexes in neurons. In astrocytes we observed increased levels of complex I free.

To ascertain the levels of complex I and complex III in cells we performed Western blot in cell extracts (C57Bl6) for complex I and complex III (**Figure 57c**), observing increased levels of complex I in astrocytes regarding complex III. This prompted us to think in a better coupling of mitochondrial electron transport chain in neurons.

Complex I assembly was analysed in Wistar rats by BNGE+IGA-CI followed by complex I detection. With this experiment we could observe high levels of complex I into supercomplexes in neurons, and increased complex I free in astrocytes (**Figure 57d**).

Thus we have observed a different organization of complex I between neurons and astrocytes in C57Bl6 mice and Wistar rats using different approaches.

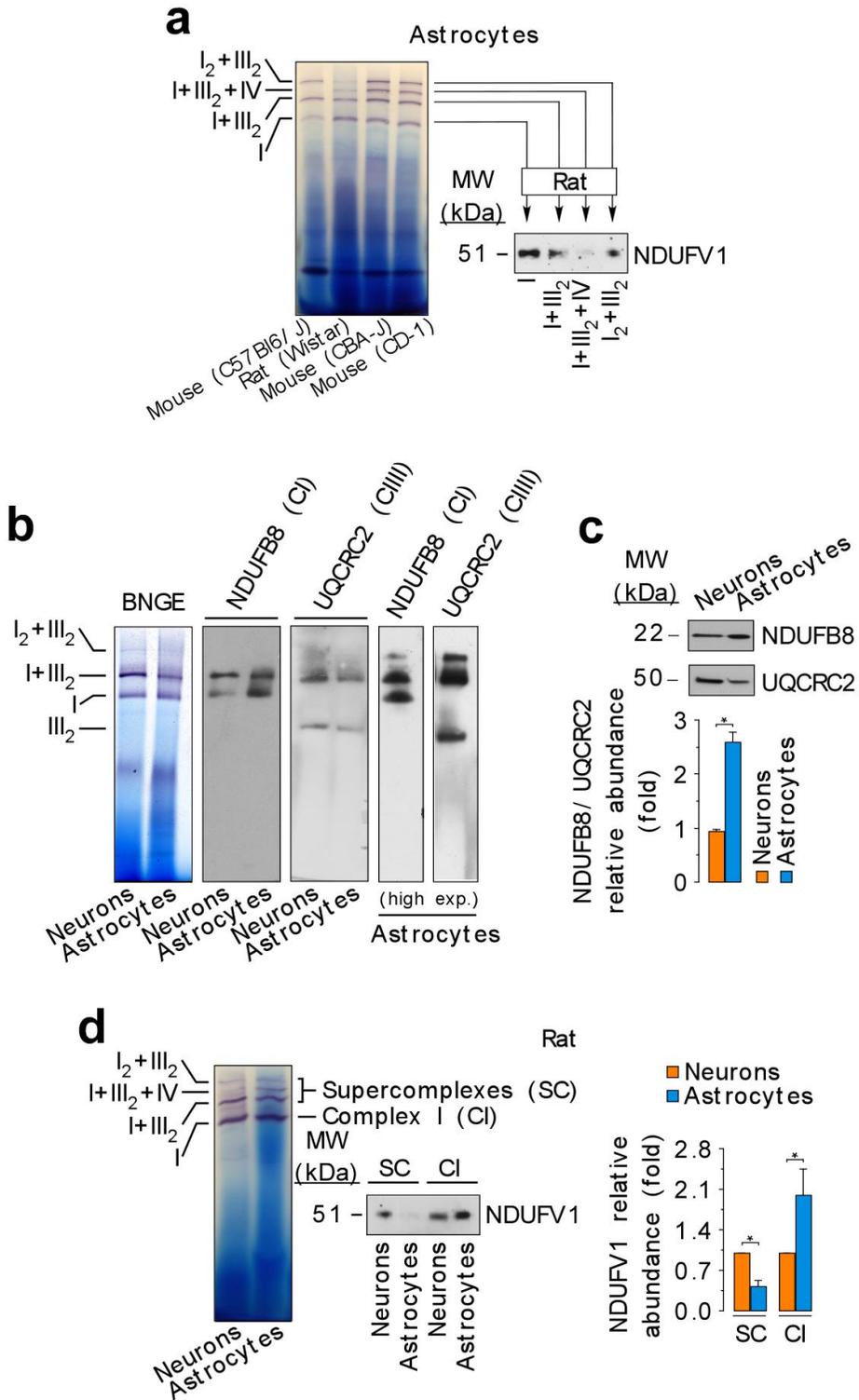


Figure 57. Complex I assembly (I)

(a) BNGE+IGA-CI in astrocytes. Detection of NDUFV1 in IGA-CI positive bands. **(b)** Assessment of complex I and III distribution in C57Bl6 mice after BNGE. **(c)** Western blot of complex I and complex III subunits in cell lysates of C57Bl6 mice. Relative densitometric quantification of complex I/complex III abundance. * $p < 0.05$ (Student's t test) ($n=3$) **(d)** BNGE+IGA-CI followed by 2D-SDS-PAGE in primary cultures of Wistar rats. Relative densitometric quantification of complex I in astrocytes vs neurons, in supercomplexes and complex I free. * $p < 0.05$ (Student's t test) ($n=3$)

In order to ascertain complex I subunits localization among BNGE, we performed mass spectrometry analysis with complexomics in neurons and astrocytes from C57Bl6 mice. We observed increased abundance of complex I subunit in supercomplexes in neurons (**Figure 58a**), as we can see in colorimetric diagrams, and in the graph, which shows relative enrichment of complex I subunits in complex I region vs supercomplexes for neurons and astrocytes.

We also performed BNGE+IGA-CI followed by 2D-SDS-PAGE in C57Bl6 mice (**Figure 58b, c**), corroborating complex I organization seen in Wistar rats (**Figure 57d**).

Like complex I is a multiproteic complex, and due to the recent reports that describe different abundance of hydrophilic subunits in complex I associated with increased levels of ROS¹⁰⁶, we also analysed NDUF51 abundance in the different localization of complex I (**Figure 58b, d**).

We observed reduced levels of NDUF51 subunit in complex I free in astrocytes regarding NDUFV1 subunit. This prompted us to think in a different composition of complex I between neurons and astrocytes, possibly explaining differences in ROS production.

To corroborate the different distribution of complex I between neurons and astrocytes, we electroeluted complex I from supercomplexes and complex I free and we measured complex I activity. We could see increased activity of complex I in complex I free region in astrocytes, confirming its accumulation in this localization (**Figure 58e**).

Like we observed differences in complex I organization, we wanted to know if this differences could explain ROS production. It's therefore we measured H₂O₂ production directly from gel slices. With this approach we could observe and increased levels of H₂O₂ production directly from complex I free in astrocytes (**Figure 58f**).

Because of these experiments we can conclude that complex I present a different organization in neurons and astrocytes. For neurons, complex I is highly assembled into supercomplexes. In the case of astrocytes, they present high levels of complex I free, with a reduced amount of NDUF51 subunit. This complex I produces high levels of ROS, so differential complex I organization and composition of complex I between neurons and astrocytes can explain differences in ROS production.

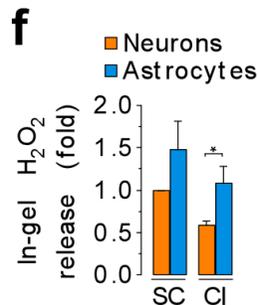
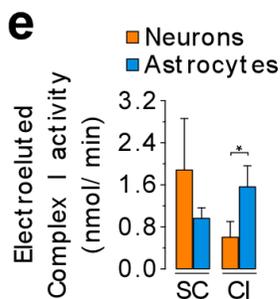
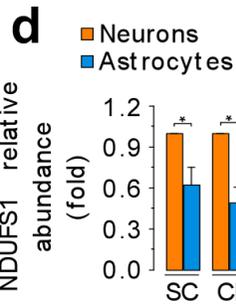
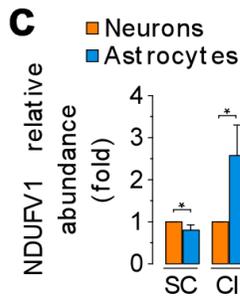
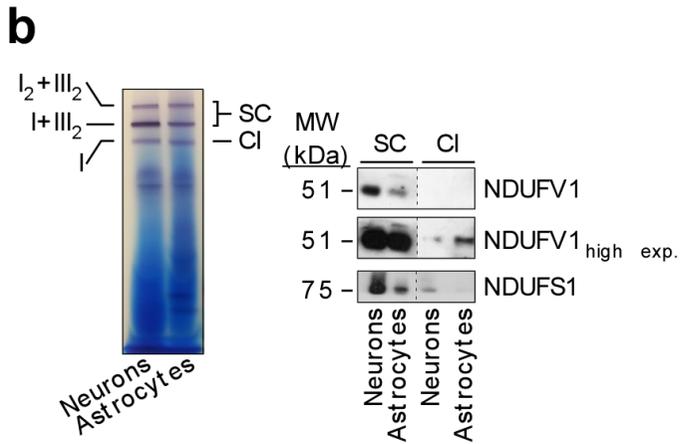
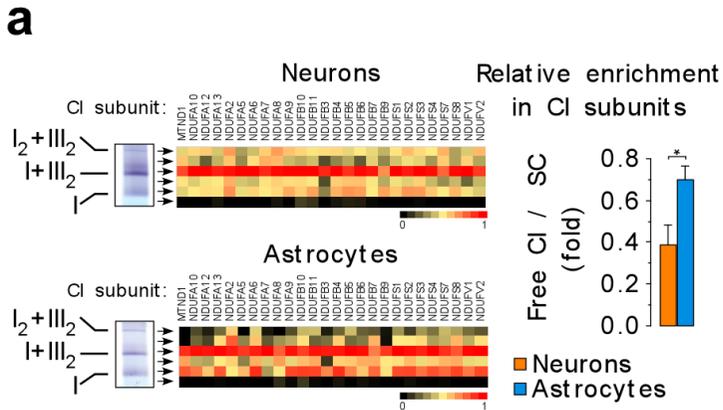


Figure 58. Complex I assembly (II)

(a) Mass spectrometry analysis of complex I subunits along different positions of BNGE from C57Bl6 mice cultures. Relative quantification of complex I subunits regarding abundance in supercomplexes. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=4) **(b)** BNGE+IGA-CI followed by 2D-SDS-PAGE in primary cultures of C57Bl6 mice, detecting NDUFV1 and NDUF51 subunits. Relative densitometric quantification of complex I subunit **(c)** NDUFV1 and **(d)** NDUF51 in astrocytes *vs* neurons, in supercomplexes and complex I free. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=3) **(e)** Complex I activity from electroeluted proteins. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=4) **(f)** H₂O₂ production from gel slices. Values are normalized per densitometric IGA-CI activity, in front of production by neuronal supercomplexes. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=4)

4.6 Modulation of complex I composition affects complex I assembly and ROS production

Like complex I in neurons presented high levels of NDUF51 subunit regarding levels in astrocytes, we silenced this subunit. We confirmed protein knockdown by Western blot, using β -actin as a loading control (**Figure 59a**). In this condition, superoxide levels increased in cell culture.

In order to assess if NDUF51 silencing affected complex I organization, we performed BNGE+IGA-CI followed by 2D-SDS-PAGE detecting NDUFV1 and NDUF51 subunits (**Figure 59b**). We observed reduced levels of complex I supercomplexes and complex I free, as we can see by Western blot and in densitometric quantifications.

H₂O₂ measurement directly from gel slices showed increased production by supercomplexes, and complex I, although not statistically significative.

Thus, NDUF51 silencing in neurons reduces complex I assembly into supercomplexes, and increases ROS production.

For astrocytes we performed the opposite strategy, we overexpressed NDUF51 subunit. We confirmed protein overexpression by Western blot, using β -actin as a loading control (**Figure 59c**). In this condition, superoxide levels were reduced in cell culture.

In order to assess if NDUF51 overexpression affected complex I organization we performed BNGE+IGA-CI followed by 2D-SDS-PAGE detecting NDUFV1 and NDUF51 subunits (**Figure 59d**). We observed increased levels of complex I supercomplexes and complex I free, as we can see by Western blot and in densitometric quantifications.

H₂O₂ measurement directly from gel slices showed reduced production by supercomplexes, and complex I free.

Therefore, changing complex I composition we can affect complex I assembly into supercomplexes, modulating ROS production.

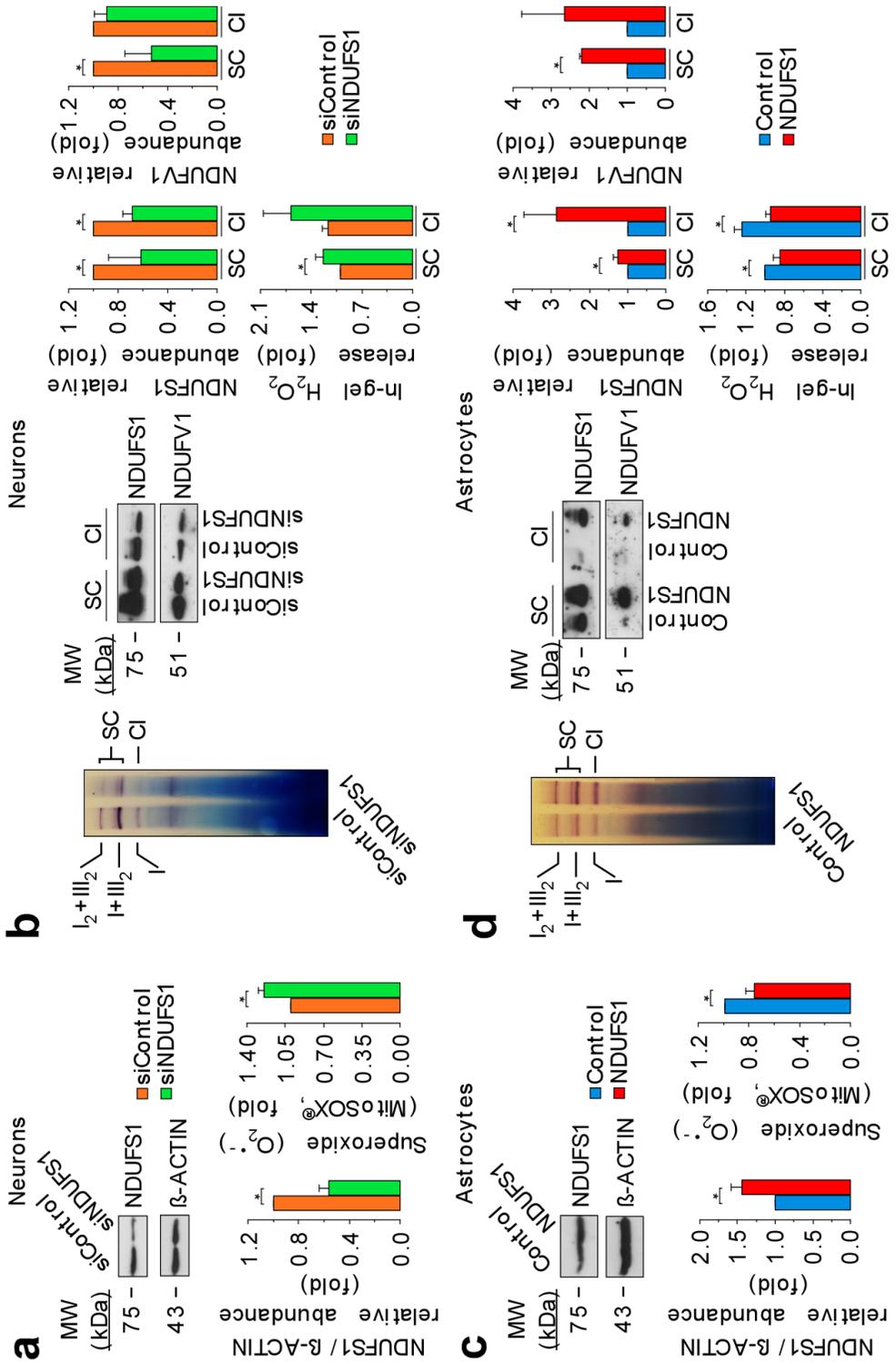


Figure 59. Modulation of complex I composition affects its assembly and ROS production

(a) NDUFS1 knockdown by siRNA. Analysis of silenced protein by Western blotting using β -actin as a loading control. Densitometric quantification of NDUFS1 abundance after NDUFS1 knockdown. * $p < 0.05$ (Student's t test) (n=3) Superoxide determination in cells treated with siControl or siNDUFS1. * $p < 0.05$ (Student's t test) (n=3) **(b)** BNGE+IGA-CI followed by 2D-SDS-PAGE in C57Bl6 neurons, detecting NDUFV1 and NDUFS1 subunits. Relative densitometric quantification of complex I subunit NDUFV1 and NDUFS1 in siNDUFS1 vs siControl, in supercomplexes and complex I free. * $p < 0.05$ (Student's t test) (n=3) H_2O_2 production from gel slices. Values are normalized per densitometric IGA-CI activity, in front of production by siControl supercomplexes. * $p < 0.05$ (Student's t test) (n=6) **(c)** NDUFS1 overexpression. Analysis of overexpression by Western blotting using β -actin as a loading control. Densitometric quantification of NDUFS1 abundance after overexpression. * $p < 0.05$ (Student's t test) (n=3) Superoxide levels in cells treated with control plasmid (pcDNA3.1) or NDUFS1. * $p < 0.05$ (Student's t test) (n=3) **(d)** BNGE+IGA-CI followed by 2D-SDS-PAGE in primary C57Bl6 astrocytes, detecting NDUFV1 and NDUFS1 subunits. Relative densitometric quantification of complex I subunit NDUFV1 and NDUFS1 in NDUFS1 vs control plasmid, in supercomplexes and complex I free. * $p < 0.05$ (Student's t test) (n=3) H_2O_2 production from gel slices. Values are normalized per densitometric IGA-CI activity, in front of production by control supercomplexes. * $p < 0.05$ (Student's t test) (n=5)

4.7 Reduction of ROS levels affects complex I assembly

We have seen like affecting complex I assembly we can modulate ROS production. In order to ascertain if this is a bidirectional process, we treated astrocytic C57Bl6 cells with GSH-EE.

Cell treatment with GSH-EE reduced levels of $O_2^{\cdot -}$ in cells (**Figure 60a**). When we performed BNGE+IGA-CI followed by 2D-SDS-PAGE against NDUFS1 subunit we observed increased levels of complex I and complex I supercomplexes (**Figure 60b**). H_2O_2 measurement directly from gel slices showed a reduction of H_2O_2 production by complex I after treatment.

In conclusion, complex I in astrocytes occurs free, with a misassembled composition (reduced levels of NDUFS1). This situation increases ROS production by complex I, generating a positive feedback of complex I released from supercomplexes.

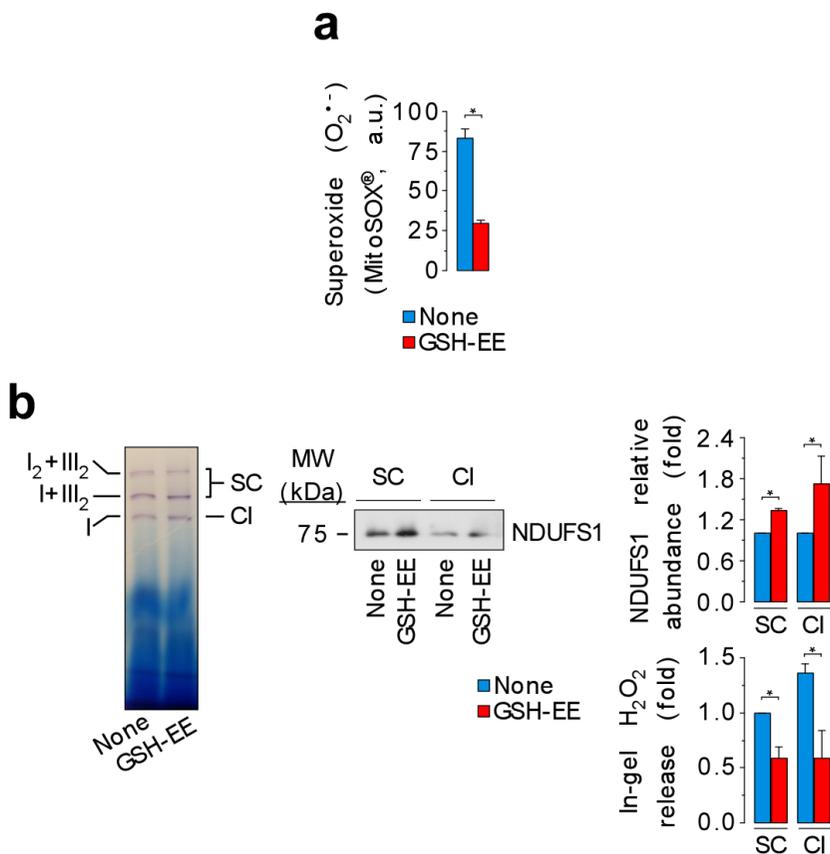


Figure 60. GSH-EE treatment reduces ROS production and modulates complex I assembly
(a) $O_2^{\cdot-}$ levels after GSH-EE treatment in C57Bl6 astrocytes. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=3) **(b)** BNGE+IGA-CI followed by 2D-SDS-PAGE in C57Bl6 astrocytes, detecting NDUFS1 subunit. Relative densitometric quantification of complex I subunit in GSH-EE vs untreated, in supercomplexes and complex I free. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=3) H_2O_2 production from gel slices. Values are normalized per densitometric IGA-CI activity, in front of production by untreated supercomplexes. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=3)

4.8 ROS produced by astrocytes have signalling role

Due to high levels of ROS observed in astrocytes, we wanted to know if they were playing a signalling role.

To study if ROS produced by astrocytes can affect neurons we performed co-cultures. We observed that the presence of astrocytes can affect $O_2^{\cdot-}$ levels in neurons. We observed a negative correlation between $O_2^{\cdot-}$ in neurons and astrocytes (**Figure 61a**).

Futhermore, the only presence of astrocytes, despite their high levels of ROS, reduced $O_2^{\cdot-}$ levels in neurons (**Figure 61b**).

Therefore, we reduced mitochondrial ROS in astrocytes by overexpression of mitoCatalase (mitoCAT). In this situation we observed reduced levels of $O_2^{\cdot-}$ (**Figure 61c**), that affected NRF2 and HIF1 α protein levels, as we can see by Western blot analysis. In this condition we determine mRNA expression of NRF2 induced genes (*HO-1* and *GCLC*) observing reduced expression levels.

Is for this reason that we can conclude than ROS in astrocytes exerts a signalling role, probably controlling antioxidants defences and cellular metabolism, thanks to NRF2 and HIF1 α stabilization.

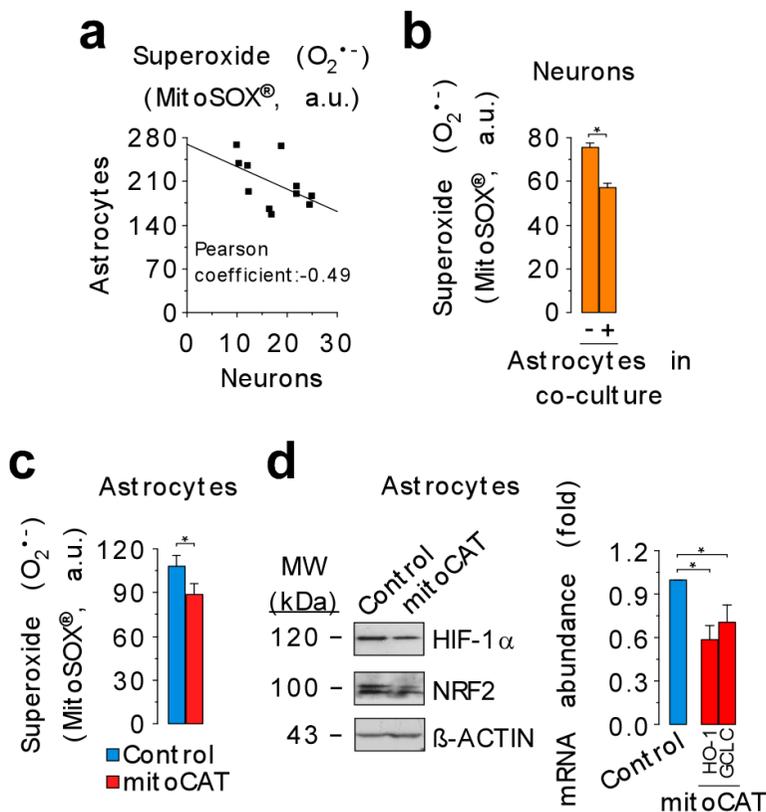


Figure 61. Astrocytic ROS plays a role in cell signalling

(a) Correlation of $O_2^{\cdot-}$ levels in neurons and astrocytes in coculture. (n=11) **(b)** $O_2^{\cdot-}$ levels in neurons in the presence of absence of astrocytes in coculture. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=3) **(c)** $O_2^{\cdot-}$ levels after mitoCAT overexpression in C57Bl6 astrocytes. * $p < 0.05$ (Student's *t* test) (n=2) **(d)** Western blot analysis of NRF2 and HIF1 α proteins. β -actin used as a loading control. mRNA expression levels of NRF2 controlled genes (*HO-1* and *GCLC*) after mitoCAT overexpression. * $p < 0.05$ (ANOVA Post-hoc Bonferroni) (n=2)

5. DISCUSSION

Astrocytes have been considered antioxidant cells in brain, due to the accumulation and production of antioxidants^{129,130,132}. This description contrasts with observations made during the elaboration of this Doctoral Thesis, in which have observed like astrocytes produce ~3 more ROS than neurons. Different production of ROS between neurons and astrocytes is not an artefact of cell culture, because it has been corroborated by two *ex vivo* approaches, observing in both of them as astrocytes are more ROS producers than neurons.

However, both ideas are not contradictory, due to ROS play a signalling role in antioxidant defences, for example, controlling NRF2 activation³⁴. Previous work of this laboratory¹³² have demonstrated like astrocytes, due to the NRF2 pathway activation, exerts neuroprotection over neurons, increasing GSH synthesis.

Also, in this Thesis has showed preliminary experiments in which ROS reduction increases NRF2 and HIF1 α expression, master regulators of antioxidant responses and cellular metabolism. Using mitoCAT approach in fibroblasts, we have demonstrated ROS implication in glycolytic metabolism⁴⁵, as a consequence of HIF1 α regulation. This process could be happening in astrocytes, realizing higher glycolytic rate in these cells in relationship with neurons^{133,144}.

At cellular level there are diverse enzymatic activities involved in ROS production. In this Thesis we have refused, using inhibitors (allopurinol y VAS2870), or reduced gene expression (sip22^{phox}), the implication of XO and NOX in high levels of ROS in astrocytes. Nevertheless, we have not refused additional sources of ROS, like mGPDH or α -ketoglutarate dehydrogenase. These enzymes produce ROS in similar situations of mitochondrial complex I (high ratio NADH/NAD⁺, ischaemia/reperfusion and in dependence of membrane potential), so clarify their contribution is complicated.

We have corroborated the implication of mitochondria in ROS production. Thanks to H₂O₂ determination in isolated mitochondria, and as a consequence of MitoSox use, we have demonstrated how at the mitochondrial level differences in ROS production are maintained, being this organelle the main source of ROS in astrocytes.

Therefore, we have determined enzymatic activities of mitochondrial complexes. For complex II-III, IV and citrate synthase we not observed differences between neurons and astrocytes, as was previously described^{129,142}. However, for complex I in Wistar rats we observed an increased activity of complex I, near ~6 fold, in astrocytes. This observation, which was previously made by Stewart *et al.*¹⁴², made us thinking in a possible implication of complex I, due to their abundance, as a main source of ROS in astrocytes. Notwithstanding, mechanism should be specie-specific, as in mice, this difference was absent.

Due to complex III and supercomplexes implication in complex I stability¹⁰⁰, we wanted to clarify SCAFI contribution I⁸³ over complex I activity. SCAFI stimulates III-IV supercomplexes formation, increasing complex III stability, and then complex I. Wistar rats presented functional isoform of SCAFI in contrast with C57Bl7 mice. Thus, we

determined mitochondrial complexes activities in mice strains (CD-1 and CBA-J) with functional expression of SCAFI. In these strains we not observed differences in complex I activity between neurons and astrocytes, except for a slight increase in CBA-J mice, minimal in comparison with Wistar rats.

Therefore, by employing different strains of mice and Wistar rats we have refused the specific activity of complex I as a factor involved in differences of ROS production in astrocytes. However, in Wistar rats we have observed a specific effect making astrocytes to have an increased activity of complex I regarding neurons. This process has not been clarified in this Thesis, because is out of our objective.

By employing mitochondrial electron transport chain inhibitors (antimycin A and rotenone), we have observed a different response of neurons and astrocytes towards complex I inhibition. Astrocytes increased $O_2^{\cdot-}$ levels in response to rotenone less than neurons. This difference could be as a consequence of high reverse electron transport in astrocytes ⁴.

To discard reverse electron transport we employed complex II inhibitor 3NP, not observing a decrease in ROS production in astrocytes. This results allowed us to discard the contribution of reverse electron transport over ROS production in astrocytes. In neurons, 3NP increased ROS production, due to a neurotoxic effect, as was described by Olsen *et al.* ¹⁴³.

Astrocytes also presented more abundance of deactive complex I, together with reduced respiration rate driven by complex I, evidencing reduced mitochondrial capacity in astrocytes. These results are in concordance with previous works which have described than neurons preferably use oxidative phosphorylation to obtain energy, whilst astrocytes use glycolysis ^{133,144}.

On the other hand, different mitochondrial capacity suggested us a highly coupled mitochondrial electron transport chain in neurons. Therefore, we analysed electron transport chain organization in primary cultures of neurons and astrocytes, observing as neurons present high levels of supercomplexes of complex I, in C57Bl6 mice and Wistar rats. However, astrocytes accumulate high levels of free complex I, increasing ROS production. So this work has demonstrated, by first time in a cellular system, evidences reported by Maranzana *et al.* ⁷⁷ over the influence of supercomplexes formation in ROS production.

These results agree with different oxygen consumption, neurons as a consequence of high abundance of supercomplexes, efficiently transfer electrons thanks to electron channeling ^{86,87}.

Furthermore, we have observed a reduced abundance of NDUF51 subunit in astrocytes. This result, is in accordance with previous work how have described that complex I can replace subunits ⁷¹, allowing the existence in cells of different pools of complex I. Moreover, during ageing complex I modulates the relative abundance of N module of complex I, increasing ROS production ¹⁰⁶.

Therefore, we evaluated how NDUFS1 abundance modulation in primary cultures of neurons and astrocytes affected ROS production and supercomplexes formation. In neurons reducing their abundance increased ROS production, reducing supercomplexes. For astrocytes, NDUFS1 overexpression increased supercomplexes reducing ROS production. Moreover, reduction of ROS levels by GSH-EE treatment affected supercomplexes formation and ROS formation by complex I.

These results evidenced a positive feedback loop between ROS generation and supercomplexes formation, process described by Genova and Lenaz ¹³, being this work the proof of this theory.

In conclusion, this work has demonstrated, in a physiological system, the relationship between ROS production and supercomplexes formation, being both process connected by a positive feedback. Furthermore, it has evidenced like ROS production in brain is regulated at cellular level, exerting a signalling role over metabolism and antioxidant response.

6. CONCLUSIONS

At the light of the results obtained in this Doctoral Thesis, we have obtained the following conclusions:

1. Astrocytes produce considerably much more reactive oxygen species (ROS) than neurons, both in cultured cells and *in vivo*. The main source of such ROS is the mitochondrial complex I via its forward electron transfer to O₂. Complex I occurs in its deactive form by a ~30% in astrocytes –in contrast to neurons, in which it occurs deactive in only a ~5%. The higher proportion of deactive complex I in astrocytes likely explains the lower efficiency of their mitochondria to drive O₂ consumption from a NADH-linked substrate, when compared with neurons.

2. In astrocytes, a large proportion of complex I occurs free, whereas in neurons most complex I is embedded into supercomplexes. The levels of complex I subunit, NDUFS1, determine complex I stability and assembly into supercomplexes. Promoting the assembly of complex I into supercomplexes (by NDUFS1 overexpression) reduces ROS in astrocytes. In contrast, promoting the disassembly of complex I from supercomplexes (by NDUFS1 knockdown) increases ROS in neurons. Thus, the modulation of supercomplexes assembly controls mitochondrial ROS production.

3. Reduction of total ROS abundance in astrocytes promotes complex I stabilization and assembly into supercomplexes, in turn leading to decreased complex I-mediated ROS production. This suggests the occurrence of a positive loop of complex I destabilization by mitochondrial ROS responsible for more ROS formation, in normal astrocytes. Furthermore, our preliminary evidence strongly suggests that such high mitochondrial ROS in astrocytes play a cell signalling physiological function likely affecting neuronal biology.

8. BIBLIOGRAFÍA



1. Brigelius-Flohé, R. & Maiorino, M. Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3289–303 (2013).
2. Kamat, C. D. *et al.* Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J. Alzheimers. Dis.* 15, 473–93 (2008).
3. Cristiana, F., Nina, Z. & Elena, A. Homocysteine in Red Blood Cells Metabolism – Pharmacological Approaches. (2012).
4. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13 (2009).
5. Zelko, I. N., Mariani, T. J. & Folz, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 337–49 (2002).
6. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95 (2002).
7. Temple, M. D., Perrone, G. G. & Dawes, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol.* 15, 319–26 (2005).
8. Sevilla, F. *et al.* The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *J. Exp. Bot.* 66, 2945–55 (2015).
9. Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B. & Karplus, P. A. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.* 1–11 (2015). doi:10.1016/j.tibs.2015.05.001
10. Cunningham, G. M. *et al.* The paradoxical role of thioredoxin on oxidative stress and aging. *Arch. Biochem. Biophys.* 576, 32–38 (2015).
11. Flohé, L. Changing paradigms in thiology from antioxidant defense toward redox regulation. *Methods Enzymol.* 473, 1–39 (2010).
12. Biteau, B., Labarre, J. & Toledano, M. B. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980–4 (2003).
13. Genova, M. L. & Lenaz, G. The Interplay Between Respiratory Supercomplexes and ROS in Aging. *Antioxid. Redox Signal.* (2015). doi:10.1089/ars.2014.6214
14. Lee, W.-K. & Thévenod, F. A role for mitochondrial aquaporins in cellular life-and-death decisions? *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C195–202 (2006).
15. Chauvigné, F., Boj, M., Finn, R. N. & Cerdà, J. Mitochondrial aquaporin-8-mediated hydrogen peroxide transport is essential for teleost spermatozoon motility. *Sci. Rep.* 5, 7789 (2015).

16. Altenhöfer, S. *et al.* The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2327–43 (2012).
17. Cantu-Medellin, N. & Kelley, E. E. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biol.* 1, 353–8 (2013).
18. Abooli, M. *et al.* Crucial involvement of xanthine oxidase in the intracellular signalling networks associated with human myeloid cell function. *Sci. Rep.* 4, 6307 (2014).
19. McLaughlin, B. a, Nelson, D., Erecińska, M. & Chesselet, M. F. Toxicity of dopamine to striatal neurons in vitro and potentiation of cell death by a mitochondrial inhibitor. *J. Neurochem.* 70, 2406–15 (1998).
20. Meiser, J., Weindl, D. & Hiller, K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun. Signal.* 11, 34 (2013).
21. Ambrus, A., Tretter, L. & Adam-Vizi, V. Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid. *J. Neurochem.* 109 Suppl , 222–9 (2009).
22. Adam-Vizi, V. & Tretter, L. The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress. *Neurochem. Int.* 62, 757–63 (2013).
23. Sazanov, L. a. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 375–388 (2015).
24. Hoefs, S. J. G., Rodenburg, R. J., Smeitink, J. a M. & van den Heuvel, L. P. Molecular base of biochemical complex I deficiency. *Mitochondrion* 12, 520–532 (2012).
25. Dröse, S. Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 578–87 (2013).
26. Mráček, T. *et al.* ROS generation and multiple forms of mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 98–111 (2014).
27. Kluckova, K. *et al.* Ubiquinone-binding site mutagenesis reveals the role of mitochondrial complex II in cell death initiation. *Cell Death Dis.* 6, e1749 (2015).
28. Rodrigues, J. V & Gomes, C. M. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide generation by human electron-transfer flavoprotein and pathological variants. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 12–9 (2012).
29. Ghelli, A. *et al.* The cytochrome b p.278Y>C mutation causative of a multisystem disorder enhances superoxide production and alters supramolecular interactions of respiratory chain complexes. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2141–51 (2013).

30. Bleier, L. & Dröse, S. Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 1320–31 (2013).
31. Holmström, K. M. & Finkel, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 411–21 (2014).
32. Lin, T.-K. *et al.* Specific modification of mitochondrial protein thiols in response to oxidative stress: a proteomics approach. *J. Biol. Chem.* 277, 17048–56 (2002).
33. Janssen-Heininger, Y. M. W. *et al.* Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1–17 (2008).
34. Kobayashi, A. *et al.* Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 221–9 (2006).
35. Niture, S. K., Jain, A. K. & Jaiswal, A. K. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J. Cell Sci.* 122, 4452–64 (2009).
36. Puente, B. N. *et al.* The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell* 157, 565–79 (2014).
37. West, a P. *et al.* TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472, 476–80 (2011).
38. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 125–30 (2011).
39. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–5 (2011).
40. Guzy, R. D. *et al.* Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* 1, 401–8 (2005).
41. Sabharwal, S. S. & Schumacker, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* 14, 709–721 (2014).
42. Dumont, M. *et al.* Mitochondrial dihydrolipoyl succinyltransferase deficiency accelerates amyloid pathology and memory deficit in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1019–27 (2009).
43. Mena, N. P., Urrutia, P. J., Lourido, F., Carrasco, C. M. & Núñez, M. T. Mitochondrial iron homeostasis and its dysfunctions in neurodegenerative disorders. *Mitochondrion* 21, 92–105 (2015).

44. Bossy-Wetzell, E., Schwarzenbacher, R. & Lipton, S. A. Molecular pathways to neurodegeneration. (2004).
45. Requejo-Aguilar, R. *et al.* PINK1 deficiency sustains cell proliferation by reprogramming glucose metabolism through HIF1. *Nat. Commun.* 5, 4514 (2014).
46. Requejo-Aguilar, R. *et al.* DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally up-regulating Pink1. *Biochem. J.* 467, 303–10 (2015).
47. Celardo, I., Martins, L. M. & Gandhi, S. Unravelling mitochondrial pathways to Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1943–57 (2014).
48. Mizuno, Y. *et al.* Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1450–5 (1989).
49. Nishioka, K. *et al.* Genetic variation of the mitochondrial complex I subunit NDUFV2 and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 16, 686–7 (2010).
50. Shibata, N. *et al.* Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res.* 917, 97–104 (2001).
51. Pollari, E., Goldsteins, G., Bart, G., Koistinaho, J. & Giniatullin, R. The role of oxidative stress in degeneration of the neuromuscular junction in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 131 (2014).
52. Johri, A., Chandra, A. & Beal, M. F. PGC-1 α , mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 37–46 (2013).
53. Chouchani, E. T. *et al.* Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature13909
54. Murphy, M. P. Antioxidants as therapies: can we improve on nature? *Free Radic. Biol. Med.* 66, 20–3 (2014).
55. Hirst, J. Towards the molecular mechanism of respiratory complex I. *Biochem. J.* 425, 327–339 (2010).
56. Dieteren, C. E. J. *et al.* Subunits of mitochondrial complex I exist as part of matrix- and membrane-associated subcomplexes in living cells. *J. Biol. Chem.* 283, 34753–34761 (2008).
57. Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D. R. & Ryan, M. T. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 851–62 (2012).
58. Vinothkumar, K. R., Zhu, J. & Hirst, J. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature13686

59. Vartak, R., Deng, J., Fang, H. & Bai, Y. Redefining the roles of mitochondrial DNA-encoded subunits in respiratory Complex I assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1531–9 (2015).
60. Janssen, R. J., Nijtmans, L. G., van den Heuvel, L. P. & Smeitink, J. a. Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* 29, 499–515 (2006).
61. Papa, S. & De Rasmio, D. Complex I deficiencies in neurological disorders. *Trends Mol. Med.* 19, 61–69 (2013).
62. Ogura, M., Yamaki, J., Homma, M. K. & Homma, Y. Mitochondrial c-Src regulates cell survival through phosphorylation of respiratory chain components. *Biochem. J.* 447, 281–9 (2012).
63. Radermacher, M. *et al.* The three-dimensional structure of complex I from *Yarrowia lipolytica*: a highly dynamic enzyme. *J. Struct. Biol.* 154, 269–79 (2006).
64. Pereira, B., Videira, A. & Duarte, M. Novel insights into the role of *Neurospora crassa* NDUFAF2, an evolutionarily conserved mitochondrial complex I assembly factor. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2623–34 (2013).
65. Ugalde, C., Janssen, R. J. R. J., van den Heuvel, L. P., Smeitink, J. a M. & Nijtmans, L. G. J. Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 13, 659–67 (2004).
66. Andrews, B., Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I. M. & Walker, J. E. Assembly factors for the membrane arm of human complex I. 2013, (2013).
67. Marcus, D., Lichtenstein, M., Saada, A. & Lorberboum-Galski, H. Replacement of the C6ORF66 assembly factor (NDUFAF4) restores complex I activity in patient cells. *Mol. Med.* 19, 124–34 (2013).
68. Nouws, J. *et al.* Acyl-CoA dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I. *Cell Metab.* 12, 283–94 (2010).
69. Heide, H. *et al.* Supplemental Information Complexome Profiling Identifies TMEM126B as a Component of the Mitochondrial Complex I Assembly Complex. 16, 1–11
70. Sheftel, A. D. *et al.* Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Mol. Cell. Biol.* 29, 6059–73 (2009).
71. Lazarou, M., McKenzie, M., Ohtake, A., Thorburn, D. R. & Ryan, M. T. Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4228–37 (2007).

72. Roberts, P. G. & Hirst, J. The deactive form of respiratory complex I from mammalian mitochondria is a Na⁺/H⁺ antiporter. *J. Biol. Chem.* 287, 34743–51 (2012).
73. Babot, M. *et al.* ND3, ND1 and 39kDa subunits are more exposed in the de-active form of bovine mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 929–39 (2014).
74. Kussmaul, L. & Hirst, J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *PNAS* 103, 7607–7612 (2006).
75. Fato, R. *et al.* Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1787, 384–392 (2009).
76. Genova, M. L. *et al.* The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron–sulfur cluster N2. *FEBS Lett.* 505, 364–368 (2001).
77. Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G. & Genova, M. L. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1469–80 (2013).
78. Chouchani, E. T. *et al.* Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat. Med.* 19, 753–9 (2013).
79. Jacquemin, G. *et al.* Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis. *Cell Death Differ.* 22, 862–74 (2015).
80. Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A. & Enriquez, J. A. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Mol. Cell* 32, 529–539 (2008).
81. Kovářová, N. *et al.* High molecular weight forms of mammalian respiratory chain complex II. *PLoS One* 8, e71869 (2013).
82. Chaban, Y., Boekema, E. J. & Dudkina, N. V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 418–26 (2014).
83. Lapuente-Brun, E. *et al.* Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340, 1567–70 (2013).
84. Genova, M. L. & Lenaz, G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 427–43 (2014).
85. Moreno-Lastres, D. *et al.* Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab.* 15, 324–35 (2012).

86. Bianchi, C., Genova, M. L., Parenti Castelli, G. & Lenaz, G. The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J. Biol. Chem.* 279, 36562–9 (2004).
87. Lenaz, G. & Genova, M. L. *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation*. 748, 107–144 (Springer New York, 2012).
88. Althoff, T., Mills, D. J., Popot, J.-L. & Kühlbrandt, W. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *EMBO J.* 30, 4652–64 (2011).
89. Blaza, J. N., Serreli, R., Jones, A. J. Y., Mohammed, K. & Hirst, J. Kinetic evidence against partitioning of the ubiquinone pool and the catalytic relevance of respiratory-chain supercomplexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 15735–40 (2014).
90. Enriquez, J. A. & Lenaz, G. Coenzyme q and the respiratory chain: coenzyme q pool and mitochondrial supercomplexes. *Mol. Syndromol.* 5, 119–40 (2014).
91. McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D. R. & Ryan, M. T. Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J. Mol. Biol.* 361, 462–9 (2006).
92. Wenz, T. *et al.* Role of phospholipids in respiratory cytochrome bc1 complex catalysis and supercomplex formation. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1787, 609–616 (2009).
93. Diaz, F., Enriquez, J. a. & Moraes, C. T. Cells Lacking Rieske Iron-Sulfur Protein Have a Reactive Oxygen Species-Associated Decrease in Respiratory Complexes I and IV. *Mol. Cell. Biol.* 32, 415–429 (2012).
94. Rosca, M., Minkler, P. & Hoppel, C. L. Cardiac mitochondria in heart failure: normal cardiolipin profile and increased threonine phosphorylation of complex IV. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 1373–82 (2011).
95. Cogliati, S. *et al.* Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 155, 160–71 (2013).
96. Acín-Pérez, R. *et al.* Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol. Cell* 13, 805–815 (2004).
97. Schagger, H. *et al.* Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 279, 36349–53 (2004).
98. Balsa, E. *et al.* NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab.* 16, 378–386 (2012).
99. Davoudi, M., Kotarsky, H., Hansson, E. & Fellman, V. Complex I function and supercomplex formation are preserved in liver mitochondria despite progressive complex III deficiency. *PLoS One* 9, e86767 (2014).

100. Calvaruso, M. A. *et al.* Mitochondrial complex III stabilizes complex I in the absence of NDUFS4 to provide partial activity. *Hum. Mol. Genet.* 21, 115–120 (2012).
101. Ikeda, K., Shiba, S., Horie-Inoue, K., Shimokata, K. & Inoue, S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat. Commun.* 4, 2147 (2013).
102. Hatle, K. M. *et al.* MCJ/DnaJC15, an endogenous mitochondrial repressor of the respiratory chain that controls metabolic alterations. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2302–14 (2013).
103. Heide, H. *et al.* Complexome profiling identifies TMEM126B as a component of the mitochondrial complex I assembly complex. *Cell Metab.* 16, 538–49 (2012).
104. Desmurs, M. *et al.* C11orf83, a mitochondrial cardiolipin-binding protein involved in bc1 complex assembly and supercomplex stabilization. *Mol. Cell. Biol.* 35, 1139–56 (2015).
105. Gómez, L. a, Monette, J. S., Chavez, J. D., Maier, C. S. & Hagen, T. M. Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart. *Arch. Biochem. Biophys.* 490, 30–5 (2009).
106. Miwa, S., Jow, H., Treumann, A. & von Zglinicki, T. Low abundance of the matrix arm of complex I of mice liver mitochondria predicts longevity. *Nat. Commun.* 1817, S59 (2014).
107. Hekimi, S., Lapointe, J. & Wen, Y. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 21, 569–76 (2011).
108. Magistretti, P. J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J. Exp. Biol.* 209, 2304–11 (2006).
109. Fields, D. Map the other brain. 5–7 (2013).
110. Llinás, R. R. Intrinsic electrical properties of mammalian neurons and CNS function: a historical perspective. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 320 (2014).
111. Sharpee, T. O. Toward functional classification of neuronal types. *Neuron* 83, 1329–34 (2014).
112. Rock, R. B. *et al.* Role of microglia in central nervous system infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 942–64, table of contents (2004).
113. Kimelberg, H. K. & Nedergaard, M. Functions of Astrocytes and their Potential As Therapeutic Targets. 7, 338–353 (2010).

114. Bayraktar, O. A., Fuentealba, L. C., Alvarez-Buylla, A. & Rowitch, D. H. Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020362 (2015).
115. Nico, B. & Ribatti, D. Morphofunctional Aspects of the Blood-Brain Barrier. *Curr. Drug Metab.* 13, 50–60 (2012).
116. Filosa, J. a, Morrison, H. W., Iddings, J. a, Du, W. & Kim, K. J. Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone. *Neuroscience* (2015). doi:10.1016/j.neuroscience.2015.03.064
117. Funk, G. D. *et al.* Neuroglia and their roles in central respiratory control; an overview. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 1–13 (2015). doi:10.1016/j.cbpa.2015.01.010
118. Perea, G., Sur, M. & Araque, A. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 1–8 (2014).
119. Rodríguez-Arellano, J. J., Parpura, V., Zorec, R. & Verkhratsky, a. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* (2015). doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.007
120. Zorec, R. *et al.* Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro* 4, 103–119 (2012).
121. Li, D., Agulhon, C., Schmidt, E., Oheim, M. & Ropert, N. New tools for investigating astrocyte-to-neuron communication. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 193 (2013).
122. Dewar, D., Underhill, S. M. & Goldberg, M. P. Oligodendrocytes and Ischemic Brain Injury. 263–274 (2003). doi:10.1097/01.WCB.0000053472.41007.F9
123. Fields, R. D. Imaging learning: the search for a memory trace. *Neuroscientist* 17, 185–96 (2011).
124. Merrill, J. E. & Scolding, N. J. Mechanisms of damage to myelin and oligodendrocytes and their relevance to disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25, 435–458 (1999).
125. Nayak, D., Roth, T. L. & McGavern, D. B. Microglia development and function. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 367–402 (2014).
126. Pellerin, L. *et al.* Evidence Supporting the Existence of an Activity-Dependent Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle. *Dev. Neurosci.* 20, 291–299 (1998).
127. Pellerin, L. & Magistretti, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10625–9 (1994).

128. Magistretti, P. J. Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 875S–880S (2009).
129. Bolaños, J. P., Heales, S. J., Land, J. M. & Clark, J. B. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J. Neurochem.* 64, 1965–1972 (1995).
130. Makar, T. K. *et al.* Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J. Neurochem.* 62, 45–53 (1994).
131. Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A. & Bolaños, J. P. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem. J.* 443, 3–11 (2012).
132. Jimenez-Blasco, D., Santofimia-Castaño, P., Gonzalez, A., Almeida, A. & Bolaños, J. P. Astrocyte NMDA receptors' activity sustains neuronal survival through a Cdk5-Nrf2 pathway. *Cell Death Differ.* (2015). doi:10.1038/cdd.2015.49
133. Herrero-Mendez, A. *et al.* The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat. Cell Biol.* 11, 747–52 (2009).
134. Almeida, A., Heales, S. J., Bolaños, J. P. & Medina, J. M. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res.* 790, 209–16 (1998).
135. Subbalakshmi, G. Y. & Murthy, C. R. Isolation of astrocytes, neurons, and synaptosomes of rat brain cortex: distribution of enzymes of glutamate metabolism. *Neurochem. Res.* 10, 239–50 (1985).
136. Starkov, A. A. Measurement of mitochondrial ROS production. *Methods Mol. Biol.* 648, 245–55 (2010).
137. Díaz, F., Barrientos, A. & Fontanesi, F. Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using blue native gel electrophoresis. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* Chapter 19, Unit19.4 (2009).
138. Bustin, S. a *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–22 (2009).
139. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.
140. Foo, L. C. Purification of rat and mouse astrocytes by immunopanning. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2013, 421–32 (2013).
141. Fulton, D. J. R. Nox5 and the regulation of cellular function. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2443–52 (2009).

142. Stewart, V. C., Land, J. M., Clark, J. B. & Heales, S. J. R. Comparison of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in rodent astrocytes and neurones and a human astrocytoma cell line. *Neurosci. Lett.* 247, 201–203 (1998).
143. Olsen, C., Rustad, A., Fonnum, F., Paulsen, R. E. & Hassel, B. 3-Nitropropionic acid: an astrocyte-sparing neurotoxin in vitro. *Brain Res.* 850, 144–149 (1999).
144. Almeida, a, Almeida, J., Bolaños, J. P. & Moncada, S. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15294–15299 (2001).
145. Morán, M. *et al.* Mitochondrial respiratory chain dysfunction: implications in neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 595–609 (2012).
146. Lenaz, G. *et al.* Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1797, 633–640 (2010).
147. Acin-Perez, R. & Enriquez, J. a. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 444–450 (2014).

ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|---|
| 2D | Segunda dimensión |
| 3NP | Ácido 3-nitropropiónico |
| AAV | Adenovirus |
| ABCD1 | <i>ATP-binding cassette, sub-family D, member 1</i> |
| Abs | Absorbancia |
| ACAD9 | Acil-coenzima A deshidrogenasa 9 |
| AD | Enfermedad de Alzheimer |
| ADP | Adenosín difosfato |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| AO | Con antioxidantes |
| AQP | Acuaporina |
| Ast | Astrocitos |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| BCA | Ácido bicinconínico |
| BNGE | <i>Blue Native Gel Electrophoresis</i> |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| cAMP | Adenosín monofosfato cíclico |
| CCCP | Cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona |
| cDNA | DNA complementario |
| CI | Complejo I |
| CII | Complejo II |
| CIII | Complejo III |
| Cit <i>c</i> | Citocromo <i>c</i> |
| CIV | Complejo IV |
| CoQ | Ubiquinona |
| COX7RP | Proteína relacionada con la citocromo <i>c</i> oxidasa, subunidad VIIa |
| C_q | Ciclo umbral |
| Cul3 | Culina-3 |
| CV | Complejo V |
| DAPI | 4',6-diamino-2-fenilindol |
| DCPIP | 2,6-Diclorofenol indofenol |
| DMEM | <i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| DNAJC15 | DnaJ (Hsp40) homólogo, subfamilia C, miembro 15 |
| DOPAL | 3,4-Dihidroxifenilacetaldehído |
| DTNB | Ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoico |
| Duox | Oxidasa dual |
| EBSS | <i>Eagle's Basal Salt Solution</i> |
| ECSIT | <i>Evolutionarily conserved signalling intermediate in Toll pathway</i> |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EGTA | Ácido etilenglicoltetraacético |
| ETF | Flavoproteína transportadora de electrones |
| FAD | Flavín adenín dinucleótido |
| FMN | Flavín mononucleótido |
| FOXRED1 | <i>FAD-dependent oxidoreductase domain containing 1</i> |
| GABA | Ácido γ-aminobutírico |
| GCLc | Glutamato cisteína ligasa catalítica |

| | |
|--------------------------------|---|
| GFAP | <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> |
| GFP | <i>Green Fluorescent Protein</i> |
| GPx | Glutación peroxidasa |
| GSH | Glutación |
| GSH-EE | Glutación etil éster |
| GSSG | Glutación oxidado |
| HBSS | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> |
| HEPES | Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico |
| HIF1α | Factor inducible por hipoxia 1- α |
| HO-1 | Hemo-oxigenasa 1 |
| IGA-CI | Ensayo de actividad del complejo I en gel |
| IND1 | Proteína Fe-S requerida para la NADH deshidrogenasa 1 |
| KEAP1 | <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i> |
| KRPG | <i>Krebs Ringer Phosphate Glucose Buffer</i> |
| Mal | Malato |
| MAO | Sin antioxidantes |
| MAP2 | <i>Microtubule-Associated Protein 2</i> |
| mGPDH | α -Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial |
| mitoCAT | Catalasa mitocondrial |
| MOPS | Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico |
| MPTP | 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina |
| mRNA | RNA mensajero |
| MTND | NADH deshidrogenasa codificada en la mitocondria |
| n.s. | No significativo |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| NDUFA | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α |
| NDUFAB | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo α/β |
| NDUFAF | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) factor de ensamblaje |
| NDUFB | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo β |
| NDUFC | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo desconocido |
| NDUFS | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) proteína Fe-S |
| NDUFV | NADH deshidrogenasa (ubiquinona) flavoproteína |
| NEM | N-etilmaleimida |
| Neu | Neuronas |
| NeuN | Proteína neuronal nuclear |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| NOX | NADPH oxidasas |
| NQO-1 | NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1 |
| NRF2 | <i>Nuclear erythroid-related factor 2</i> |
| NTBZ | Nitroazul de tetrazolio |
| OPA-1 | <i>Optic atrophy 1</i> |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PD | Enfermedad de Parkinson |
| PDL | poli-D-lisina |
| PGK | Fosfoglicerato quinasa |
| PHD | Prolil hidroxilasas |

| | |
|----------------------------------|--|
| PINK1 | PTEN inducible quinasa 1 |
| Pir | Piruvato |
| PM | Peso molecular |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| Prx | Peroxirredoxina |
| PSA | Persulfato amónico |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| RT-qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real |
| SC | Supercomplejos |
| SCAFI | Factor de ensamblaje de supercomplejos I |
| SDH | Succinato Deshidrogenasa |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SDS-PAGE | Electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS |
| SEM | Error estándar de la media |
| SF | Suero fetal |
| siRNA | Ácido ribonucleico pequeño de interferencia |
| SOD | Superóxido Dismutasa |
| TEMED | N,N,N,N'-tetrametilendiamina |
| TMEM126B | Proteína transmembrana 126B |
| TNFα | Factor de necrosis tumoral α |
| Trx | Tiorredoxina |
| TrxR | Tiorredoxina reductasa |
| u.a. | Unidades arbitrarias |
| UCQQ3 | Factor de ensamblaje del complejo ubiquinol-citocromo <i>c</i> reductasa 3 |
| UQCRC2 | Ubiquinol citocromo <i>c</i> reductasa, proteína nuclear 2 |
| VDAC | <i>Voltage-Dependent Anion Channel</i> |
| XO | Xantina oxidasa |
| $\Delta\Psi_m$ | Potencial de membrana mitocondrial |