



Las especies reactivas de oxígeno mitocondriales regulan la neurogénesis durante el desarrollo de la corteza cerebral

TESIS DOCTORAL
Regina Mengual Fenollar

DIRECCIÓN

Prof^a Dra. Ángeles Almeida Parra

Prof^a Dra. María Delgado Esteban

Salamanca, 2023

Dra. Ángeles Almeida Parra, Investigadora Científica del CSIC en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG, Universidad de Salamanca, CSIC) y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Dra. María Delgado Esteban, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por Regina Mengual Fenollar, titulado **“Las especies reactivas de oxígeno mitocondriales regulan la neurogénesis durante el desarrollo de la corteza cerebral”**, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de doctor por la Universidad de Salamanca y autorizan su presentación.

Y para que así conste, firman la presente certificación en Salamanca, a 14 de junio de 2023.



Fdo.: Ángeles Almeida Parra

Fdo.: María Delgado Esteban



Este trabajo ha sido financiado con proyectos de investigación concedidos por el Instituto de Salud Carlos III (CP0014/00010, PI18/00265, PI21/00727 y RD21/0006/0005, co-financiados por la Unión Europea) y la Junta de Castilla y León (CSI151P20; Escalera de Excelencia CLU 2017-03 cofinanciada por la Unión Europea FEDER/FSE+ and Next (GenerationEU). Regina Mengual obtuvo un contrato predoctoral de personal investigador de la Junta de Castilla y León (EDU/556/2019).

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	13
1. PRINCIPALES ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)	14
1.1 Propiedades químicas de las principales ROS.....	17
2. FUENTES INTRACELULARES DE LAS ROS	19
2.1 Las mitocondrias.....	20
2.2 Las NADPH oxidasas (NOX).....	22
2.3 El retículo endoplasmático	23
2.4 Los lisosomas.....	24
2.5 Los peroxisomas	24
2.6 Otras fuentes de ROS.....	25
2.6.1 Enzimas generadoras de ROS	25
2.6.2 Fuentes extracelulares de ROS	25
3. LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES	27
3.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos.....	27
3.1.1 La superóxido dismutasa	27
3.1.2 La catalasa	28
3.1.3 El sistema de las tioredoxinas (Trxs)	28
3.1.4 El ciclo redox del glutatión	29
3.2 Los sistemas antioxidantes no enzimáticos	30
4. EL ESTRÉS OXIDATIVO	31
5. LAS ESPECIES REACTIVAS Y SU FUNCIÓN EN LA SEÑALIZACIÓN CELULAR	33
5.1 ROS en la modulación de la vía antioxidante Nrf2	35
5.2 Las especies reactivas y su función en la modulación de la vía HIF-1 α	37
5.3 Las especies reactivas y su función en la regulación del crecimiento celular	38
5.4 Las especies reactivas y su función en el control de la diferenciación celular	38
5.5 Las especies reactivas y su función durante el envejecimiento	39
5.6 Las ROS mitocondriales y su función en el metabolismo celular y el comportamiento cerebral	41
6. NEUROGÉNESIS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	42
6.1 Formación del tubo neural.....	42

6.2 Desarrollo de la corteza cerebral	43
6.3 Estructura de la corteza cerebral.....	45
6.4 Factores reguladores de la neurogénesis cortical	46
6.5 ROS en el desarrollo del sistema nervioso central	48
6.6 Modelo de estudio del desarrollo del cerebro: Neuroesferas.....	50
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	51
MATERIAL Y MÉTODOS.....	54
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	55
1.1 Modelo de ratón mCAT.....	55
1.2 Extracción de ADN.....	57
1.3 Genotipado de los animales	58
1.4 Electroforesis en gel de Agarosa	59
2. CULTIVOS CELULARES	59
2.1 Cultivo primario de neuronas corticales	59
2.2 Cultivo de neuroesferas	61
3. EXTRACCIÓN DE MITOCONDRIAS DE LAS NEUROFERAS	63
4. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	63
4.1 Determinación de peróxido de hidrógeno.....	63
4.2 Determinación de anión superóxido	65
4.3 Determinación de anión superóxido extracelular	66
5. DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS.....	66
6. DETERMINACIÓN DEL ESTADO OXIDATIVO DE LAS PROTEÍNAS EN LAS NEUROESFERAS.....	68
7. TRANSFERENCIA TIPO WESTERN BLOT	69
5.1 Extracción de proteínas.....	69
5.2 Determinación de la concentración de las proteínas.....	69
5.3 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	70
5.4 Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas por Western Blot.....	71
5.5 Reutilización de las membranas de nitrocelulosa mediante Stripping	73

5.6 Tinción de geles con SDS-PAGE con azul de coomassie	74
8. INMUNOCITOQUÍMICA.....	74
9. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN MEDIANTE TINCIÓN CON BrdU EN NEUROESFERAS PRIMARIAS.....	77
10. ANÁLISIS DE CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO Y TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO	77
11. ANÁLISIS DE LA CANTIDAD DE GLUTATIÓN EN NEUROESFERAS PRIMARIAS	78
12. EXTRACCIÓN DE ARN DE LAS NEUROESFERAS PRIMARIAS Y CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS.....	80
13. ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD NEURONAL MEDIANTE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR.....	81
14. ANÁLISIS DE LA DIFERENCIACIÓN DE LOS LINAJES CELULARES OBTENIDOS A PARTIR DE LAS NEUROESFERAS PRIMARIAS	84
15. MEDIDA DE LA LONGITUD TELOMÉRICA	85
16. ENSAYO DE MIGRACIÓN DE NEUROESFERAS.....	86
17. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO.....	86
18. INMUNOFLUORESCENCIA IN VIVO.....	88
16.1 Análisis de proliferación in vivo.....	90
16.2 Tinción mediante Nissl.....	91
19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	91
RESULTADOS.....	93
I. BLOQUE 1	94
1. La reducción endógena de las mROS altera la diferenciación neuronal.....	94
2. La reducción de las mROS provoca cambios en la actividad neuronal.....	98
3. La reducción de las mROS afecta a la distribución y morfología de las mitocondrias	99
II. BLOQUE 2.....	103
1. La reducción de las mROS no altera el tamaño de la corteza cerebral.....	103

2. La reducción endógena de las mROS altera la diferenciación y la proliferación celular, lo que desestructura la corteza cerebral.....	105
2.1 La reducción de las mROS altera la diferenciación de los progenitores neurales...	105
2.2 La reducción endógena de las mROS altera la proliferación de los progenitores neurales.....	109
III. BLOQUE 3	112
1. La reducción endógena de los mROS induce cambios morfológicos en las neuroesferas	112
2. La expresión de la catalasa en la mitocondria (mCAT) es un sistema eficiente para reducción endógena de los niveles de ROS celulares y mitocondriales	114
3. La reducción endógena de las mROS no induce la muerte celular por apoptosis.....	115
4. La reducción endógena de las mROS disminuye la proliferación de las NPCs	116
5. La disminución endógena de las mROS provoca senescencia celular	120
6. Las neuroesferas mCAT presentan una alta oxidación proteica global	123
7. La disminución endógena de los niveles de mROS incrementa la expresión de las NADPH oxidasas.....	124
8. Las mROS endógenas modulan la defensa antioxidante.....	125
9. La reducción endógena de mROS no afecta a la migración celular de las neuroesferas primarias	127
10. Los mROS afectan a la diferenciación neural.....	128
DISCUSIÓN	¡Error! Marcador no definido.
CONCLUSIONES	141

ABREVIATURAS

7-AAD: 7-amino-actinomicina D

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de la Varianza

APC: Aloficocianina

ARE: Elemento de respuesta antioxidante

ARN: Ácido Ribonucleico

ATP: Adenosina trifosfato

BB: *Binding Buffer*

BCA: Ácido bicinónico

BSA: Albumina de suero bovino

BrdU: Bromodesoxiuridina

CAT: Catalasa

cDNA: DNA codificante

CMV: Citomegalovirus

COX: Ciclooxygenasa

CP: Placa cortical

CTE: Cadena de transporte electrones

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidracina

DTNB: 5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzoico

EGF: *Epidermal Growth Factor*

EBSS: Solución basal salina de Eagle

ERO1: *Endoplasmatic oxidoreductin 1*

FBS: Suero fetal de ternera

β -FGF: Basic Fibroblast Growth Factor

FQR: ubiquinona oxidorreductasa

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

γ -GCS: g-Glutamilcisteina sintetasa

GPx: Glutation peroxidasa

G6PD: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

GPDH: Glicerol-fosfato deshidrogenasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

GST: Glutación transferasa

HCl: Ácido clorhídrico

HIF-1: Factor 1 inducible de hipoxia

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HOCl: Ácido hipocloroso

HOM-1: Hemooxigenasa 1

IP: Yoduro de propidio

IZ: Interzona

KRPG: *Krebs Ringer Phosphate Glucose Buffer*

LO: Lipooxigenasa

MAO: Monoamina oxidasas

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

mCAT: mitocatalasa (proteína/gen)

MOPS: 3-(n-morfolino) ácido propanesulfónico

NAD⁺: Nucleótido de nicotinamida y adenina (oxidado).

NADH(H⁺): Nucleótido de nicotinamida y adenina (reducido)

NADP⁺: Nucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (oxidado)

NADPH(H⁺): Nucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (reducido)

NEC: Células neuroepiteliales

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO: Óxido nítrico

NPCs: Células precursoras neurales

NQO1: NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1

NOX: NADPH oxidasas

NRF2: *Nuclear factor erythroid-derived 2 - like 2*

O₂^{•-}: Anión superóxido

OGDH: 2-oxoglutarato deshidrogenasa

•OH: radical hidroxilo

ONOO⁻: Peroxinitrito

OXPHOS: Fosforilación oxidativa

PB: Tampón fosfato

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PDHs: Prolil-hidroxilasas

PDI: Proteínas disulfuro isomerasas

PI3K-AKT o PI3K-PKB: fosfatidil inositol 3 kinasa- Proteína kinasa B

PP: *Preplate*

Prx: Peroxirredoxinas

qPCR: PCR cuantitativa o PCR a tiempo real

RE: Retículo endoplasmático

RGC: Célula de la glía radial

RIPA: *Radioimmunoprecipitation assay buffer*

RNS: Especies Reactivas de Nitrógeno

mROS: Especies reactivas de oxígeno mitocondriales

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

SAPK/JNK: Proteína quinasa activada por estrés

S.E.M.: Error estándar de la media

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD1 o Cu/ZnSOD: Superóxido Dismutasa 1 o Cu/Zn-superóxido dismutasa

SOD1 o Cu/ZnSOD: Superóxido Dismutasa 1 o Cu/Zn-superóxido dismutasa

SDS: Dodecil sulfato sódico

SVZ: Zona subventricular

Tbr2: *T-box brain protein 2*

Txnrd: Tiorredoxina Reductasa

TRxs: Tiorredoxinas

TTBS: Tampón tris salino con tween 20

TEMED: N, N, N, N'-tetrametilendiamina

XO: Xantina oxidasa

VZ: Zona Ventricular

wt: *wild type* en referencia a genotipos silvestres

Introducción

1. PRINCIPALES ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

La vida ha evolucionado creando organismos que dependen del O₂ para obtener grandes cantidades de energía metabólica a partir de la oxidación de biomoléculas (Lane, 2002). El O₂ constituye casi el 21 % de la atmósfera de la Tierra y es la tercera molécula más abundante del universo (Taverne et al., 2018). De hecho, la vida en este entorno ha supuesto la adaptación de los organismos a la convivencia con esta molécula y con sus derivados, que reciben el nombre de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés, *reactive oxygen species*). ROS, es un término colectivo que engloba a diversas especies químicas, originadas a partir de la reducción incompleta de oxígeno (Fridovich, 1998). Estas moléculas pueden generarse como subproductos del metabolismo celular normal o por exposición a factores estresantes ambientales, como la radiación ultravioleta, la contaminación del aire o las toxinas.

Las ROS desempeñan un doble papel en los sistemas vivos. Por un lado, son moléculas capaces de generar estrés oxidativo, dañando los componentes celulares, incluidos el ADN, las proteínas y los lípidos (Bolaños et al., 1994; Bolaños et al., 1995; Moro et al., 2005; Bolaños et al., 2009). Por otro lado, en determinadas situaciones, las ROS, actúan como segundos mensajeros que activan respuestas beneficiosas (Buetler et al., 2004; Murphy et al., 2011; Kaludercic et al., 2016; Di Mao and Venditti, 2020). Además, las ROS también están involucradas en la respuesta de defensa inmune, en la que participan en la activación de los mecanismos necesarios en la lucha frente a los patógenos (Zhang et al., 2016). Asimismo, las ROS desempeñan un papel importante en los mecanismos fisiopatológicos durante el desarrollo de numerosas enfermedades, como son las cardiovasculares (Halliwell, 1989; Herkert et al., 2004; Halliwell,

1989; Rahman et al., 2012), las neurodegenerativas (Bolaños et al., 2009; Thanan et al., 2014, Bolaños et al., 2009), la diabetes (Rahman et al., 2012) y el cáncer (Valko et al., 2004), así como durante el envejecimiento (Viña et al., 2013; Garaschuk et al., 2018).

Junto a las ROS, otras especies reactivas también tienen un impacto notable en la biología redox, entre ellas se encuentran las especies reactivas de nitrógeno, cloro y bromo (**Tabla 1**). Las especies reactivas de nitrógeno (RNS; *reactive nitrogen species*) incluyen entre otras moléculas el óxido nítrico (NO^\bullet) y el peroxinitrito (ONOO^\bullet). El NO^\bullet participa en varios procesos biológicos como el control de la presión sanguínea, la inhibición de la agregación plaquetaria, la neurotransmisión y la remodelación sináptica (Nathan and Shiloh, 2000). Además, las RNS pueden ser citotóxicas y causar estrés nitrosativo (Bolaños et al., 2004), por lo que tienen una función dual, como ocurre con las ROS. Entre las especies reactivas de cloro y bromo destaca el ácido hipocloroso (HOCl), que es un poderoso oxidante que interactúa con la mayoría de las macromoléculas celulares. Cuando el ácido hipocloroso reacciona con las macromoléculas celulares, puede causar alteraciones en su estructura y función. Por ejemplo, puede oxidar los grupos sulfhidrilo ($-\text{SH}$) presentes en las proteínas, lo que puede afectar su actividad biológica. Además, puede reaccionar con los dobles enlaces insaturados de los lípidos, causando peroxidación lipídica y dañando las membranas celulares. Por otro lado, el bromo es una molécula altamente electronegativa e inestable, lo que hace que posea gran avidéz por los átomos de hidrógeno del agua y se disuelva con facilidad cuando se encuentra a bajas concentraciones. Sin embargo, su elevada electronegatividad también la convierte en una molécula oxidante, aunque

no tanto como el cloro o el oxígeno, cuando el bromo se encuentra a elevadas concentraciones se convierte en una molécula tóxica (Gray et al., 2013).

Tabla 1. Principales especies reactivas. Adaptada de Sies et al., 2022

Especies reactivas de oxígeno (ROS)	
Radicales libres	No radicales libres
Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Radical hidroxilo (OH\cdot)	Hidroperóxido (ROOH)
Radical peroxilo (ROO\cdot)	Singlete oxígeno molecular ($1O_2$)
Radical alcoxilo (RO\cdot)	Ozono (O_3)
Especies reactivas de nitrógeno (RNS)	
Radicales libres	No radicales libres
Óxido nítrico (NO\cdot)	Nitrito (NO_2^-)
Dióxido de nitrógeno (NO$_2^{\cdot}$)	Nitrato (NO_3^-)
	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
	Peroxinitrato (O_2NOO^-)
	Nitrosoperoxicarbonato ($ONOOCO_2^-$)
	Ácido peroxinitroso ($ONOOH$)
Especies reactivas de cloro/bromo	
Radicales libres	No radicales libres
Cloro atómico (Cl\cdot)	Hipoclorito (ClO^-)
Bromo atómico (Br\cdot)	Cloraminas (RNHCl)
	Hipobromito (BrO^-)
	Ácido hipocloroso ($HOCl$)

1.1 Propiedades químicas de las principales ROS

A) Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 no es un radical libre, ya que no posee electrones desapareados, pero tiene una alta capacidad prooxidante, que puede dañar las estructuras celulares. Es estable y posee una gran capacidad para difundir a través de los compartimentos celulares, gracias al transporte mediado por acuaporinas (Buettner, 2011): El H_2O_2 se puede formar a partir de diferentes reacciones (Sies et al., 2017) que se detallan a continuación:

i) La detoxificación del $\text{O}_2^{\cdot -}$ por las Superóxido dismutasas:



ii) La reducción directa de una molécula de O_2 por dos electrones:



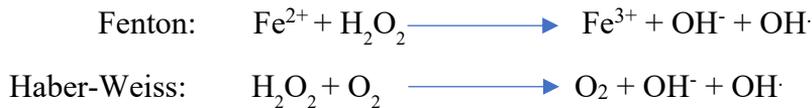
B) Hidroperóxidos orgánicos (ROOH). Estas ROS incluyen hidroperóxidos formados enzimáticamente y no enzimáticamente mediante peroxidación lipídica, a partir de ácidos grasos poliinsaturados y esteroides (como es el colesterol). Intervienen en la señalización celular, sobre todo en el sistema inmunitario, y están implicados en la muerte celular por ferroptosis (Sies et al., 2022).

C) Oxígeno molecular singlete ($^1\text{O}_2$). El $^1\text{O}_2$ es una forma electrónicamente excitada del O_2 . Su generación por fotoexcitación hace que el O_2 sea particularmente importante en los tejidos expuestos a la luz, como la piel y el ojo. Por quimioexcitación también se forma en reacciones enzimáticas en la oscuridad (Sies and Menck, 1992).

D) Ozono (O_3). El O_3 es un poderoso oxidante que plantea un problema de salud en algunas zonas geográficas, especialmente como consecuencia de la contaminación del aire, causando estrés oxidativo en el tejido pulmonar, entre otros (Voter et al., 2001).

E) Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El $O_2^{\cdot-}$ es una de las especies reactivas de oxígeno más estudiadas (Buettner, 2011). Se genera en la mitocondria durante el proceso de respiración celular y también como consecuencia de la actividad de enzimas específicas como son, la xantina oxidasa (XO), la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa (COX), las NADPH oxidasas (NOX), y la lipooxigenasa (LO) (Cadenas and Sies, 1998, Brand, 2020). Debido a su carga negativa, el $O_2^{\cdot-}$ es relativamente impermeable a las membranas celulares. Sin embargo, a pH fisiológico, este radical puede ser protonado para formar el radical hidropéroxilo (HO_2^{\cdot}), que es un compuesto más lipofílico y puede difundir a través de las membranas celulares (Winterbourn, 2020; Sies and Jones, 2020).

F) Radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Es la especie más reactiva, tiene una vida promedio de 10^{-9} segundos. Puede reaccionar fuertemente con moléculas orgánicas e inorgánicas, incluyendo el ADN, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos, por lo que son las ROS potencialmente más dañinas. Este radical se le considera un potente iniciador de la peroxidación lipídica. Debido a su alta reactividad, su acción se limita a sitios cercanos del lugar de producción (Sies et al., 2017). Se genera a partir de H_2O_2 por reducción en la reacción de Fenton catalizada por metales (Fe^{2+}) o a través de la reacción de Haber-Weiss (Kehrer, 2000):



G) Radical peroxilo (ROO^\cdot). Se forma tras el inicio de la reacción en cadena libre de los ácidos grasos en la peroxidación lipídica. Los radicales peroxilo propagan las reacciones en cadena de los radicales libres abstrayendo un protón de un ácido graso poliinsaturado, creando así un hidroperóxido lipídico y un radical carbónico (Spitteler, 2007).

H) Radical alcoxilo (RO^\cdot). Se forman como intermediarios en la peroxidación lipídica por descomposición catalizada por metales de hidroperóxidos lipídicos. (Spitteler, 2007).

2. FUENTES INTRACELULARES DE LAS ROS

Las ROS se generan, fisiológicamente, en varios orgánulos intracelulares, siendo las mitocondrias uno de los principales productores de ROS durante el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones (CTE). El retículo endoplásmico también es una fuente importante de ROS, ya que su función principal es la síntesis y plegamiento de proteínas, lo que puede resultar en estrés oxidativo y producción de ROS. Los peroxisomas también generan ROS, como subproducto del metabolismo de los lípidos y los ácidos grasos. Además, como se indicó previamente, las ROS pueden generarse durante la actividad de determinadas enzimas como parte de sus ciclos de reacción, como son las NOX, la XO, la COX y la LO (Holmsstrom and Finkel, 2014), mencionadas en el apartado

1.2 de la Introducción. Todas estas fuentes intracelulares de ROS se describen de manera más detallada a continuación.

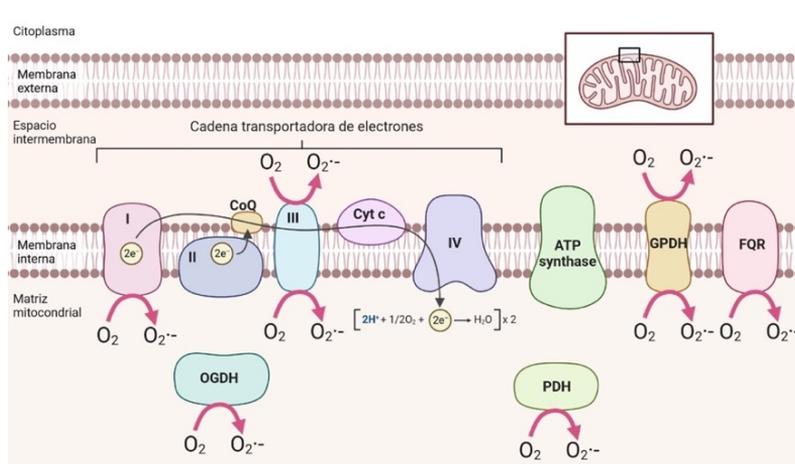
2.1 Las mitocondrias

Las mitocondrias son, cuantitativamente, las mayores fuentes de ROS en la mayoría de las células de mamíferos (Murphy, 2009). Estos orgánulos generan ATP de una manera dependiente del oxígeno, durante la cual el flujo de electrones culmina en el complejo IV de la CTE, con la reducción de oxígeno a agua. A lo largo de este proceso, entre el 1 % y el 3 % de oxígeno puede someterse a una reducción de un electrón para generar $O_2^{\cdot-}$ (Green et al., 2011; Murphy, 2009). No obstante, este porcentaje puede aumentar en determinadas situaciones como la hipoxia, las estimulaciones con calcio y durante el desarrollo de ciertas alteraciones que afectan al sistema nervioso central (Zheng et al., 2022).

Dentro de la mitocondria, se han identificado varios sitios de producción de $O_2^{\cdot-}$ (**Esquema 1**), siendo los principales los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (Ubiquinona-Citocromo c reductasa) de la CTE (Brand, 2010). El complejo I produce $O_2^{\cdot-}$ cuando la razón NADH/NAD⁺ es alta, lo que sucede en condiciones de mutaciones en los complejos, isquemia, pérdida de citocromo c, o alta concentración de NADH como consecuencia de una baja demanda energética. En presencia de inhibidores de la CTE, como la rotenona, capaces de interaccionar en el sitio de unión de la ubiquinona en el complejo I, también se genera $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, en ciertas ocasiones la producción de $O_2^{\cdot-}$, ocurre de manera reversa. Así, en condiciones patológicas, como es la reperusión tras la isquemia, la oxidación rápida del succinato por el complejo II reduce el conjunto de coenzimas

Q (Co-Q), lo que hace que los electrones retrocedan hacia el complejo I, un proceso conocido como transporte de electrones inverso, que es una importante fuente de ROS que se inhibe por la rotenona (Murphy, 2009).

Otras enzimas metabólicas localizadas en la membrana interna mitocondrial como la ubiquinona oxidorreductasa (FQR) y la glicerol-fosfato deshidrogenasa (GPDH) o enzimas presentes en la matriz mitocondrial como la piruvato deshidrogenasa (PDH) y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH), son capaces también de producir $O_2^{\cdot-}$ (**Esquema 1**) (Holmstrom and Finkel, 2014). El $O_2^{\cdot-}$ se convierte rápidamente en H_2O_2 por acción de la superóxido dismutasa 2 (SOD2 o la manganeso SOD; MnSOD), localizadas dentro de la mitocondria.

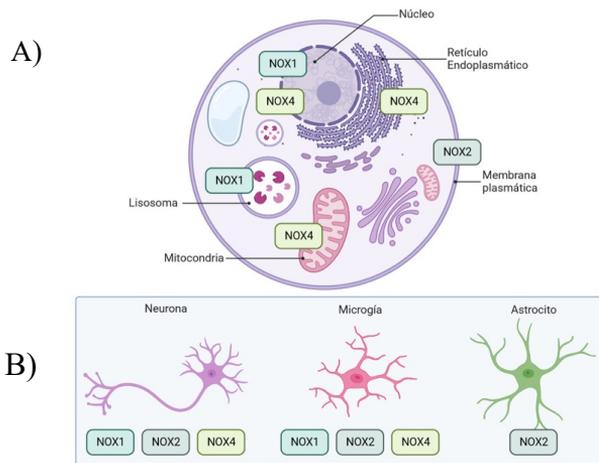


Esquema 1. Lugares de producción de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial. Cuantitativamente, el complejo I y el complejo III de la cadena de transporte de electrones son los sitios principales de producción de $O_2^{\cdot-}$, tanto en la matriz de la mitocondria como en el espacio interno de la membrana mitocondrial. Otros generadores de $O_2^{\cdot-}$ incluyen enzimas metabólicas de la matriz mitocondrial, como OGDH (2-oxoglutarato deshidrogenasa) y PDH (piruvato deshidrogenasa), y las formas de membrana mitocondrial de GPDH (glicerol 3-fosfato deshidrogenasa) y el FQR (electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase). Adaptada de Holmstrom and Finkel, 2014.

2.2 Las NADPH oxidasas (NOX)

A la familia de las NOX, se las conoce por su capacidad de generar ROS. Estas enzimas están formadas por complejos proteicos asociados a las membranas celulares y su actividad enzimática consiste en la reducción de oxígeno para producir $O_2^{\cdot-}$, utilizando NADPH como donador y el oxígeno como aceptor final de electrones (Vermot et al., 2021). En la mayoría de los mamíferos, se han identificado siete isoformas diferentes: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2. Estas isoformas comparten una estructura catalítica básica formada por las subunidades proteicas p22phox y gp91phox, que juntas conforman un complejo conocido como flavocitocromo b558 (Nayernia et al., 2014).

Las diferencias entre estas isoformas se centran en su capacidad para generar ROS y se adaptan a las necesidades del tejido donde se expresan. Por ejemplo, la isoforma NOX2 juega un papel destacado en la respuesta inmunitaria innata. Esta isoforma se expresa mayoritariamente en los neutrófilos y durante la respuesta inmune frente a patógenos externos. Así, los neutrófilos llevan a cabo una explosión oxidativa, que implica la producción de ROS para eliminar la invasión. En el sistema nervioso central (SNC), se expresan principalmente las isoformas NOX 1-4 (**Esquema 2**), aunque en ciertas circunstancias no se descarta la expresión de otras isoformas distintas. Estas enzimas pueden desempeñar roles importantes en la regulación del estrés oxidativo, la señalización celular y la homeostasis en el SNC (Bedard and Krause, 2007; Belarbi et al., 2017).



Esquema 2. Localización celular de cada una de las isoformas de las NADPH oxidasas (NOX). A) Diagrama que muestra la ubicación subcelular de los miembros de la familia de las NADPH oxidasas en una célula hipotética del cerebro y B) diagrama que muestra la localización celular de los miembros de la familia de la NADPH oxidasa en las células cerebrales (Belarbi et al., 2017).

2.3 El retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo celular que está involucrado en la síntesis y el plegamiento de proteínas. La proteína ERO1 (*endoplasmatic oxidoreductin 1*), presente en el RE, utiliza el poder oxidativo del oxígeno molecular para generar enlaces disulfuro en las proteínas sintetizadas en el RE, lo que favorece su correcta conformación. Sin embargo, este mecanismo oxidativo también genera ROS como subproducto. Además de ERO1, varias enzimas de la familia de las NOX también se encuentran localizadas en el RE, lo que sugiere que el RE es una fuente importante de ROS dentro de la célula. Estas enzimas de NOX colaboran con proteínas de la maquinaria de plegamiento del RE, como las proteínas disulfuro isomerasas (PDI), que catalizan la formación de puentes disulfuro durante el plegamiento de proteínas. Las PDI contienen dominios tipo

tioredoxina que les permiten catalizar la isomerización o la formación de enlaces disulfuro inter- o intramoleculares (Yoboue, Sitia, and Simmen, 2018).

2.4 Los lisosomas

Los lisosomas contienen varias enzimas hidrolíticas que son capaces de generar tanto $O_2^{\cdot-}$ como H_2O_2 durante la degradación de macromoléculas. Estas enzimas incluyen la NOX2, la cual se encuentra presente en los lisosomas de células fagocíticas y genera $O_2^{\cdot-}$, como subproducto durante la fagocitosis (Görlach et al., 2015). Otras enzimas lisosomales como la lisozima, la elastasa y la colagenasa pueden generar ROS durante la degradación de sustratos, lo que puede contribuir a la generación de estrés oxidativo si no son adecuadamente detoxificadas por los sistemas antioxidantes celulares (Kurz et al., 2010).

2.5 Los peroxisomas

Los peroxisomas tienen un papel fundamental en el metabolismo celular, participando en la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga, la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato, la síntesis de fosfolípidos, purinas, poliaminas y aminoácidos, y la síntesis de ácidos grasos específicos y otros metabolitos importantes para el crecimiento y la función celular (Walker et al., 2018). Muchas de las proteínas involucradas en estos procesos son oxidasas dependientes de flavinas, que producen H_2O_2 como subproducto. No obstante, es la β -oxidación la actividad que más contribuye a la formación de ROS en este orgánulo en forma de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, a través de la XO peroxisomal. Precisamente, la alta expresión de la enzima catalasa (CAT) en este orgánulo tendría como objetivo la detoxificación del H_2O_2 resultante de la β -oxidación hasta O_2 y H_2O (Schrader and Fahimi, 2004).

2.6 Otras fuentes de ROS

2.6.1 Enzimas generadoras de ROS

La contribución relativa de una amplia gama de enzimas como fuentes adicionales de ROS, varía según el tipo de célula, pero en condiciones basales, suelen ser menores en comparación con las mitocondrias o las NOX (Holmström and Finkel, 2014). Entre estas se encuentra la XO, responsable de la conversión de hipoxantina en ácido úrico, constituye una fuente importante de $O_2^{\cdot-}$ y su amplia distribución le confiere un importante papel en situaciones fisiopatológicas como la isquemia/reperfusión (Parks and Granger, 1986). Otras enzimas generadoras de ROS son las monoamina oxidasas (MAO-A y MAO-B), localizadas en la membrana externa de la mitocondria en diferentes tejidos en mamíferos. Son enzimas que catalizan la oxidación de monoaminas por liberación de H_2O_2 . Estas enzimas desempeñan un papel importante en la degradación de los neurotransmisores como la dopamina y noradrenalina (Gaweska and Fitzpatrick, 2011).

2.6.2 Fuentes extracelulares de ROS

La radiación ionizante es una fuente importante de ROS y RNS. Los efectos de ésta pueden alterar la estructura atómica de las macromoléculas celulares y pueden continuar durante días e incluso meses después de la exposición inicial. Los cambios oxidativos pueden ocurrir tanto en las células irradiadas como en sus células progenitoras, lo que puede dar lugar a una amplia gama de daños oxidativos, como la carbonilación de proteínas, la peroxidación lipídica y el aumento de las tasas de mutaciones genéticas espontáneas. Asimismo, la exposición a la radiación ionizante también puede estimular la actividad de las

oxidasas, lo que puede contribuir a la generación continua de ROS y RNS (Azzam et al., 2012).

Los metales pesados como el hierro, el cobre, el cadmio, el níquel, el arsénico y el plomo también juegan un papel esencial en la producción de las ROS y RNS (Ściskalska et al., 2014). El hierro y el cobre pueden inducir la producción de radicales libres, a través de reacciones de tipo Fenton o Haber-Weiss, mientras que otros metales pesados, como el cadmio, el níquel, el arsénico y el plomo, pueden estimular la actividad de NOX, desplazar cationes esenciales de sitios de unión específicos de enzimas e inhibir las actividades enzimáticas, por su afinidad por los grupos sulfhidrilo (-SH) en la enzima. El plomo, en particular, puede provocar peroxidación lipídica y alterar el equilibrio entre el glutatión reducido (GSH) y el oxidado (GSSG), lo que genera que las células sean más propensas al daño oxidativo. El arsénico, por su parte, puede inducir la producción de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} , lo que interrumpe varias vías de señalización celular y causa daño en el ADN, peroxidación lipídica y alteración de los niveles de enzimas antioxidantes (Yang et al., 2017).

La mayoría de los tratamientos con quimioterapéuticos elevan los niveles intracelulares de ROS, y muchos pueden alterar la homeostasis redox de las células cancerosas (Kohanski et al., 2007). De hecho, el mecanismo de acción de muchos de estos fármacos implica la apoptosis mediada por ROS.

3. LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES

3.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos

Las células nerviosas han desarrollado sistemas antioxidantes enzimáticos para contrarrestar el exceso de ROS y mantener su homeostasis. Entre los sistemas enzimáticos más importantes destacan las diferentes isoformas de la SOD, la CAT, el sistema de tiorredoxinas (Trxs) y las enzimas del ciclo redox y síntesis del glutati6n, como son la glutati6n peroxidasa (GPx), glutati6n reductasa (GR), glutati6n-S-transferasa (GST) y γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS). Estas enzimas colaboran en la regulaci6n del pool intracelular de glutati6n reducido (GSH), uno de los principales antioxidantes celulares no enzimáticos (Nathan and Cunningham-Bussel, 2013) (**Esquema 3**).

3.1.1 La super6xido dismutasa

Existen diferentes isoformas de la SOD, seg6n el grupo prost6tico ligado (Cu, Zn, Mn o Fe). La SOD de Fe se presenta principalmente en procariotas, mientras que la SOD de Mn y la de Cu/Zn se localizan tanto en procariotas como en eucariotas. En eucariotas, se han definido las siguientes formas de SOD: en el citosol (SOD1 o Cu/Zn-SOD), en la mitocondria (SOD2 o Mn-SOD) y en el espacio extracelular (SOD3) (Buetter, 2011). Todas estas enzimas se encargan de neutralizar rpidamente el $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Okado-Matsumoto and Fridovich 2001). Esta conversi6n tiene una gran relevancia fisiol6gica, debido a que la reactividad del H_2O_2 es mucho menor que la del $O_2^{\cdot-}$. Como hemos indicado previamente, el H_2O_2 es relativamente estable, con una vida media celular de ~ 1 ms y niveles de estado estacionario $\sim 10^{-7}$ M (D'Autr6aux and Toledano 2007). Adem6s, posee una gran

capacidad para difundir a través de las membranas. Por lo tanto, el H₂O₂ tiene un profundo impacto en la homeostasis redox como agente señalizador (Sies et al., 2017; Young et al., 2019) y sus niveles necesitan ser regulados estrictamente.

3.1.2 La catalasa

La CAT es una enzima que se encuentra en prácticamente todos los organismos vivos y es esencial para la protección de las células contra el estrés oxidativo. La función principal de la catalasa es catalizar la descomposición del H₂O₂ en agua y oxígeno (**Esquema 3**) (Loew, 1900):



La CAT tiene una estructura homotetramérica, donde cada subunidad posee un grupo hemo que contiene un átomo de hierro y un anillo de porfirina que forman el sitio activo de la enzima. El grupo hemo es esencial para la actividad de la CAT, ya que es el lugar donde se produce la reacción química con el H₂O₂ (Chelikani, Fita, and Loewen 2004). La catalasa se distribuye ampliamente por los tejidos, localizándose, fundamentalmente, en los peroxisomas, aunque también se ha descrito su presencia en el citosol, así como en la mitocondria del corazón de rata y ratón (Glorieux and Calderon, 2017; Gebicka and Krych-Madej, 2019).

3.1.3 El sistema de las tiorredoxinas (Trxs)

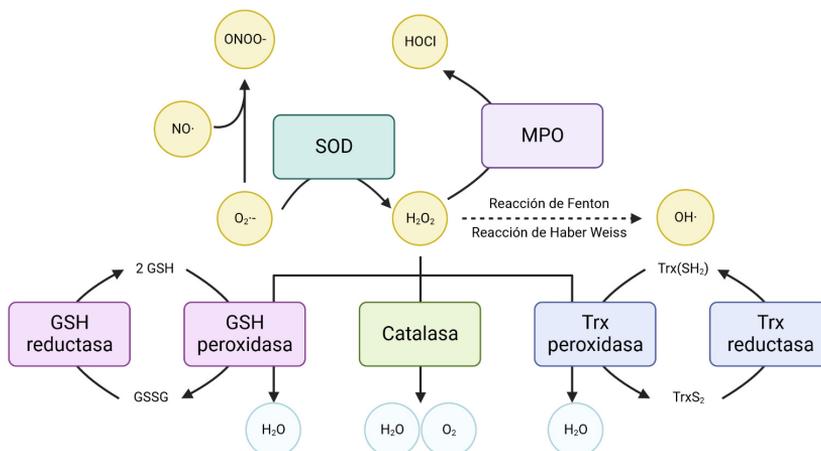
El sistema de las Trxs está compuesto por peroxirredoxinas (Prx), Trxs y tiorreductasas (Txnrd). Las Prx son proteínas de bajo peso molecular que actúan como antioxidantes, facilitando la reducción de otras proteínas a través de un

intercambio tiol-disulfuro en la cisteína, gracias a dos residuos de cisteína que poseen (Rhee, 2016). Son ubicuas y se encuentran conservadas en muchos organismos. Estas enzimas reaccionan con el H_2O_2 y posteriormente se reducen por el sistema TRxs/Txrnd (**Esquema 3**). Esto requiere un equivalente de NADPH para regenerar los residuos de cisteína de la Prx (Holmgren and Lu, 2010).

3.1.4 El ciclo redox del glutatión

El ciclo redox del glutatión (γ -glutamil-cisteinil-glicina) es un proceso importante en el que el glutatión se oxida (GSSG) y se reduce (GSH) en respuesta a los niveles de estrés oxidativo (**Esquema 3**). En este proceso, el GSH se convierte en GSSG o glutatión disulfuro, mediante la acción de enzimas GPx y GST. Esta reacción se produce cuando el GSH reacciona con el H_2O_2 y otras ROS, que se generan durante el metabolismo normal y en respuesta al estrés oxidativo. El GSSG se regenera nuevamente a GSH, mediante la acción de la enzima GR y la ayuda de la coenzima NADPH (Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013).

Las células de mamíferos contienen cinco isoformas de la GPx, que usan como cofactor el selenio (Kursvietiene et al., 2020): la citosólica GPx1, la gastrointestinal GPx2, la plasmática GPx3, la fosfolípido hidroxidasa GPx4 y la GPx6, que se expresa solo en el sistema olfativo. Todas las GPx pueden reducir el H_2O_2 y los hidroperóxidos de ácidos grasos. Sin embargo, GPx4 también reduce hidroperóxidos en lipoproteínas y lípidos complejos tales como los ésteres de colesterol y los fosfolípidos (Thomas et al., 1990).



Esquema 3. Mecanismos de acción de los principales sistemas antioxidantes enzimáticos. Aparecen representados los principales sistemas antioxidantes enzimáticos: SOD: superóxido dismutasa, Catalasa, enzimas del ciclo redox del glutatión y del sistema de tiorredoxinas. También se detallan las reacciones que producen radical hidroxilo (OH^\cdot), así como la formación de especies reactivas del nitrógeno y del cloro.

3.2 Los sistemas antioxidantes no enzimáticos

Los enzimas no son el único componente del sistema de defensa antioxidante, tal y como se comentó anteriormente en el apartado 3.1. Se han descrito moléculas que pueden contrarrestar el efecto de las ROS de forma no enzimática. A continuación, se detallan algunas de ellas.

A) Glutatión. Es un tripéptido presente en todos los tejidos de mamíferos a concentraciones de 1-10mM como el tiol no proteico más abundante que actúa contra el estrés oxidativo. Se puede encontrar de dos maneras como GSH, o bien como GSSGH, al estar formado por dos moléculas de GSH unidas por puentes disulfuro. En el ciclo redox del glutatión participan diferentes enzimas y se describió en el apartado 3.1.4 Aunque la síntesis de GSH sólo ocurre en el

citoplasma, en las células eucariotas éste se encuentra en casi todos los compartimentos celulares, incluido el núcleo. El glutatión es una molécula multifuncional que tiene una participación en varios procesos celulares, siendo imprescindible en la supervivencia celular. Así, participa en procesos como la proliferación celular, la apoptosis y la respuesta inmune. (Wu et al., 2004, Borrás et al., 2004)

B) Vitamina E: Es una vitamina liposoluble con una alta capacidad antioxidante. Existen ocho estereoisómeros diferentes de la vitamina E, pero solo el α -tocoferol es la forma más bioactiva en los seres humanos. Debido a que es soluble en grasa, el α -tocoferol se acumula en las membranas celulares y ayuda a protegerlas del daño causado por los radicales libres. Su función antioxidante se debe, principalmente, a su capacidad para proteger contra la peroxidación lipídica (Traber and Atkinson, 2007).

C) Vitamina C o Ácido ascórbico: Es una vitamina hidrosoluble que se encuentra en muchos alimentos, como frutas cítricas, bayas, brócoli y pimientos. Además de sus propiedades antioxidantes, la vitamina C es esencial para la síntesis de colágeno, carnitina y neurotransmisores. También es importante para la salud cardiovascular, la función inmunológica y la prevención del cáncer. Es un potente agente reductor que ayuda a eliminar los radicales libres en el cuerpo y puede ayudar a regenerar otras moléculas antioxidantes, como la vitamina E y el glutatión (Lykkesfeldt, 2020).

4. EL ESTRÉS OXIDATIVO

En base a todo lo expuesto anteriormente, la homeostasis redox requiere una importante y estricta regulación, ya que la desregulación de esta provoca estrés

oxidativo. El término estrés oxidativo se define como una perturbación en el balance prooxidante-antioxidante a favor del primero, lo que provoca daño (Sies, 1985). Este daño recibe el nombre de daño oxidativo y se define como el daño causado por el ataque de las especies reactivas sobre los constituyentes de los organismos vivos, principalmente el ADN, los lípidos y las proteínas (Halliwell and Whiteman, 2004).

En concreto, las moléculas de ADN están sujetas al ataque por parte de radicales hidroxilos, que generan una gran cantidad de productos modificados en la base o en el azúcar. La lesión en el ADN más estudiada es la formación de la 8-hidroxi-2-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) (Rowe et al., 2008; Sies et al., 2017). Este daño conduce a la formación de mutaciones génicas, roturas de cadena doble y simple e inestabilidad de microsatélites, lo que afecta la unión de los factores de transcripción (Rowe et al., 2006).

Por otro lado, los radicales libres son moléculas altamente reactivas que pueden oxidar a los aminoácidos presentes lo que lleva a la desnaturalización y pérdida de la actividad enzimática de la proteína. La presencia de grupos carbonilos en las proteínas se considera un marcador de oxidación mediada por ROS. Las proteínas pueden ser modificadas por tres vías: a través de la modificación oxidativa de los aminoácidos específicos, la escisión peptídica mediante radicales libres y la formación de enlaces cruzados proteína-proteína (Davies, 2016). Se sabe que algunos aminoácidos como la L-metionina, la L-cisteína, la L-arginina y la L-histidina son particularmente sensibles a la oxidación por casi todas las formas de ROS (Chevion et al., 2000). Entre los sistemas más relevantes que causan oxidación proteica, encontramos diversos los complejos de la CTE mitocondrial, las NOX y la XO, entre otras (Stadtman., et al 1992).

Los lípidos, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados, son altamente susceptibles al ataque de las ROS. La peroxidación lipídica es un proceso que ocurre cuando los lípidos son oxidados por las ROS, lo que resulta en una reacción en cadena que puede causar daño celular. El proceso de peroxidación lipídica comienza con el secuestro de un hidrógeno de un ácido graso, lo que convierte al ácido graso en un radical libre. Este radical libre secuestra, a su vez, un hidrógeno de otro ácido graso, propagando así la cadena de reacciones. Esto conduce a la formación de una variedad de especies reactivas, incluyendo radicales alquilo, peroxilo e hidroperoxilo. Uno de los productos más abundantes de la peroxidación lipídica es el malondialdehído, que se utiliza ampliamente como indicador de daño lipídico y estrés oxidativo. La peroxidación de los lípidos en las membranas celulares puede tener varios efectos negativos, alterando las propiedades biofísicas de las membranas, como su grado de fluidez, lo que puede interferir con su función normal. Además, las especies reactivas generadas durante la peroxidación pueden dañar los componentes celulares, incluyendo los receptores de membrana. Esto puede llevar a la inactivación de los receptores y alterar la función celular en su conjunto (Ayala et al., 2014).

5. LAS ESPECIES REACTIVAS Y SU FUNCIÓN EN LA SEÑALIZACIÓN CELULAR

Las concentraciones elevadas de ROS o de RNS alteran la homeostasis redox y generan una situación de estrés celular que es perjudicial para las células. Sin embargo, las concentraciones bajas o moderadas de estas especies desempeñan un papel importante en la regulación celular y en la señalización redox (Ozben, 2007; Sies et al., 2022; Oswald et al., 2018). A estos niveles fisiológicos, se ha demostrado que participan en la neuroprotección en respuesta a la excitotoxicidad

(muerte neuronal asociada a la sobre-estimulación de receptores de glutamato). Así, bajos niveles de ONOO^- , o concentraciones subtóxicas, son capaces de promover la supervivencia celular a través de la activación de la vía de señalización antiapoptótica, fosfatidil inositol 3 kinasa- Proteína kinasa B (PI3K-AKT o PI3K-PKB), mediante un mecanismo que implica la oxidación y subsiguiente inactivación de su inhibidor, la fosfatasa PTEN y en respuesta a la excitotoxicidad (Delgado-Esteban et al., 2007).

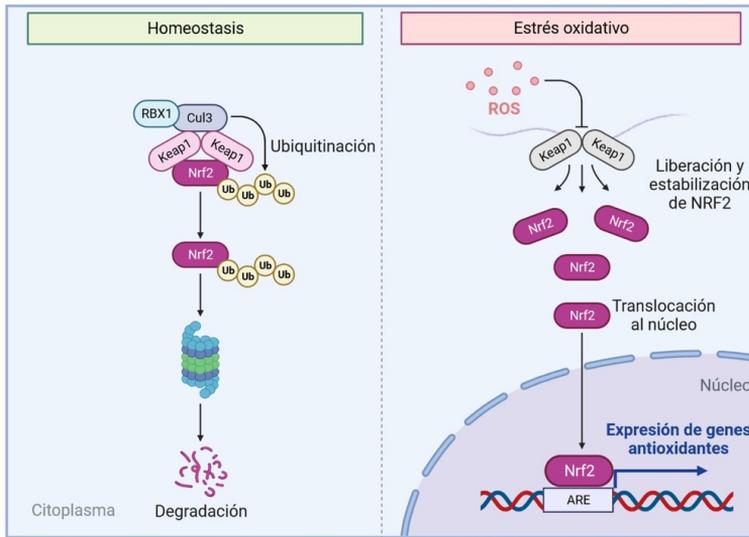
De hecho, las proteínas que contienen cisteínas y tirosinas, como PTEN, son especialmente sensibles a la oxidación, lo que sugiere la existencia de redes funcionales de proteínas sujetas a la regulación redox. Estas modificaciones son reversibles y generan una gran variedad de respuestas celulares. Mediante su interacción con las proteínas, las ROS afectan a diferentes vías de señalización implicadas en diversos procesos celulares como el crecimiento, la migración y la muerte celular, así como a la formación de tumores, la angiogénesis, la detección de oxígeno y la respuesta inmune (Sies and Jones, 2020; Halliwell and Gutteridge, 2015).

El H_2O_2 surgió como el principal metabolito implicado en la señalización y la regulación redox (Rampon et al., 2018, Jackson et al., 2020). La generación de este metabolito en las células puede tener efectos, tanto beneficiosos como deletéreos, en función de su concentración, el tipo celular y el contexto fisiológico en el que se encuentra (Sies et al., 2017, Circu and Aw, 2010, Mariho et al., 2014). Se ha demostrado que su rango fisiológico está entre 1 y 10 nmoles (Wilson et al., 2018). Las concentraciones elevadas de H_2O_2 (superiores a 100 nM) representan una condición nociva y estresante definida como estrés oxidativo. Por otro lado, se ha visto que concentraciones anormalmente bajas de H_2O_2 (por ejemplo, por

debajo de 1 nM), que pueden deberse a la pérdida de función del complejo NOX2 o a el uso de antioxidantes sintéticos a altas dosis, como la N-acetil cisteína, afectarían a la polarización de las neuronas del hipocampo y al crecimiento axonal, inhibiendo el desarrollo neuronal (Wilson et al., 2015).

5.1 ROS en la modulación de la vía antioxidante Nrf2

En las células eucariotas, existen sistemas reguladores que protegen contra el estrés oxidativo inducido por ROS. La vía Keap1-Nrf2 es el principal regulador de estas respuestas protectoras (Sandberg et al. 2014). En el **Esquema 4**, se describe la regulación de este sistema antioxidante, en el que participan las proteínas Nrf2 (*nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*) y Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). En condiciones normales, la Keap1 se une a Nrf2 y promueve su degradación a través del proteasoma, manteniendo así bajos niveles de Nrf2 en el citoplasma. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, los residuos de Cys de Keap1 se oxidan, alterando su conformación y liberando a Nrf2 (Yamamoto and Motohashi, 2018; Vargas and Jonhson, 2009). Entonces, Nrf2 se transloca al núcleo y se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en las regiones reguladoras de los genes diana, lo que promueve la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes y enzimas involucradas en la biosíntesis de antioxidantes, entre los que se encuentran la Hemo-oxigenasa-1 (HOM-1) y la NAD(P)H deshidrogenasa [quinona] 1 (NQO1) (Taguchi *et al.*, 2011).



Esquema 4. Respuesta antioxidante mediada por Nrf2 en condiciones normales y durante el estrés oxidativo (modificado de Yamamoto et al., 2018).

Además de la vía Keap1-Nrf2, existen otras vías que contribuyen a la protección contra el estrés oxidativo en eucariotas. Una de ellas, es la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), que pueden activar la expresión de genes antioxidantes, a través de la fosforilación de factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (Sies and Jones, 2020, Mitchell et al., 2016). La vía de señalización PI3K-AKT y la vía de señalización de la proteína quinasa activada por estrés (SAPK/JNK), también pueden contribuir a la regulación de la expresión de genes antioxidantes (Weinberg, 2011).

5.2 Las especies reactivas y su función en la modulación de la vía HIF-1 α

HIF-1 es un factor de transcripción que juega un papel importante en la respuesta celular frente al estrés hipóxico (Semenza, 2012, 2004). Está compuesto por dos subunidades: HIF-1 α , que se regula por la disponibilidad de oxígeno, y HIF-1 β , que es constitutivo.

En normoxia o condiciones normales de oxígeno, HIF-1 α se degrada vía proteasoma, previa hidroxilación por parte de las prolil-hidroxilasas (PDH), en dos residuos de prolina específicos (Pro402 y Pro564), y a continuación es reconocido por una proteína llamada VHL, que dirige a HIF1 hacia el proteasoma (Kaelin and Ratcliffe, 2008). Las PDH se activan por acción del α -cetoglutarato que se forma en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En ausencia de oxígeno, las PDH, no pueden activarse y por lo tanto no pueden hidroxilar a HIF-1 α y por lo tanto no se puede degradar, se acumula y transloca al núcleo, donde forma un complejo con HIF-1 β . Este complejo activa la transcripción de genes implicados en la adaptación a la hipoxia (GLUT 1 y 4 HK, PGI, PFKFB3, LDH y además PDK1, inhibiendo la fosforilación oxidativa (Semenza, 2012; Lee et al., 2020).

Otros factores como la presencia de ROS y alteraciones en el metabolismo celular también pueden activar HIF-1 α (Semenza, 2012). Concretamente se ha descubierto que la producción de $O_2^{\cdot -}$ por el complejo III está asociada con la estabilización de HIF-1 α (Andreyey, 2016). La activación de HIF-1 puede tener efectos tanto beneficiosos como perjudiciales en la célula, dependiendo del contexto y la duración de la activación. Por ejemplo, la activación de HIF-1 puede promover la angiogénesis y la supervivencia celular en condiciones de hipoxia,

pero también puede contribuir a la progresión tumoral y la resistencia a la terapia (Semenza, 2012; Kareans et al., 2021).

5.3 Las especies reactivas y su función en la regulación del crecimiento celular

El H_2O_2 es necesario para la activación de una serie de vías celulares implicadas en el crecimiento celular, en situaciones fisiológicas. De hecho, se ha observado que las células madre neurales o progenitores neurales (NPCs) (Reynolds and Weiss, 1992), requieren niveles relativamente altos de ROS para prosperar adecuadamente, al menos *in vitro* (Wilson et al., 2018). Así, las neuroesferas tratadas con difenilyodonio, un inhibidor farmacológico de NOX, disminuye su tasa de proliferación y ésta se rescató tras el tratamiento con H_2O_2 . Además, se ha descrito que NOX2 mantiene el estado proliferativo de las NPCs través de la modulación de la vía PI3K/AKT/mTOR, un mecanismo de señalización bien estudiado involucrado en la proliferación y supervivencia celular (Le Belle et al., 2011). En otros trabajos, se ha descrito que la reducción de los niveles endógenos de ROS, mediante el uso de antioxidantes, inhibe significativamente la proliferación de los precursores neurales, mientras que la linsidomina (SIN-1), un generador de $ONOO^-$, promueve la actividad proliferativa de las NPCs derivadas del hipocampo embrionario (Chen et al., 2018).

5.4 Las especies reactivas y su función en el control de la diferenciación celular

Un estudio reciente ha demostrado que la eliminación de ROS, mediante la sobreexpresión de GPx, retrasa la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos multipotentes de *Drosophila Melanogaster*. Sin embargo, el aumento de ROS mediante el agotamiento de la NADH-ubiquinona

oxidorreductasa (ND75) del complejo I mitocondrial aumenta la diferenciación (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009).

Es más, la reducción de las ROS mitocondriales (mROS) mediante el uso de antioxidantes dirigidos a las mitocondrias impide la diferenciación de las células madre mesenquimales humanas en adipocitos (Tormos et al., 2011), lo que sugiere que se requieren mROS para la diferenciación también en mamíferos. Recientemente, se ha demostrado que los niveles fisiológicos de H₂O₂ promueven el establecimiento de una correcta polaridad neuronal y de un correcto crecimiento de las neuritas y de axones en neuronas del hipocampo de rata. Así, tras la inhibición de NOX2, las neuronas no se polarizan correctamente y se altera la especificación axonal. Por el contrario, una ganancia de función de NOX2, inducida por la sobreexpresión de la subunidad reguladora p47phox citoplasmática, aumenta fuertemente el crecimiento axonal, lo que provocaría una diferenciación acelerada sin causar muerte celular (Wilson et al., 2016).

5.5 Las especies reactivas y su función durante el envejecimiento

Las especies reactivas tienen un papel importante en el proceso de envejecimiento. La teoría del envejecimiento por radicales libres, propuesta por Denham Harman, sugiere que el daño celular acumulativo causado por las ROS, que son productos secundarios del metabolismo oxidativo, contribuye al envejecimiento (Harman, 1956). Como ya hemos indicado, las ROS pueden dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en las células, lo que puede causar disfunción celular y acelerar el envejecimiento. Además, cambios en la dinámica mitocondrial parecen estar relacionadas con este efecto ya que conducen a un aumento del estrés oxidativo.

En este contexto, se ha demostrado que la dinámica mitocondrial es esencial para la capacidad regenerativa exitosa de las células madre, ya que la pérdida de la fisión mitocondrial que se observa durante el envejecimiento o el deterioro genético desregula la CTE (Balsa et al., 2019), afectando a la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Busch et al., 2014), a la mitofagia (Twig et al., 2008) y produciendo un aumento del estrés oxidativo. Esto impide la regeneración tisular, es decir, la pérdida o alteración de la fisión mitocondrial impide el cambio de estado quiescente a proliferativo. Por tanto, la forma y la dinámica mitocondrial controlan las funciones regenerativas de las células madre al regular el metabolismo y la proteostasis (Hong et al., 2022).

Sin embargo, también se ha demostrado que los niveles moderados de ROS pueden tener efectos beneficiosos en la prolongación de la vida útil (Schieber and Chandel, 2014). Los estudios realizados en numerosos modelos de diferentes organismos han demostrado que un ligero aumento de ROS prolonga la vida. En levaduras, se ha descubierto que la inhibición de la vía mTOR utilizando rapamicina (Weichart, 2018) o la restricción calórica, prolongan la vida útil al aumentar las mROS. En *Caenorhabditis elegans* la pérdida de la actividad de la SOD mitocondrial, pero no citosólica, también incrementa el tiempo de vida. Este fenómeno también se ha observado en mamíferos (Mesquita et al., 2010). Concretamente en ratones transgénicos, se ha observado que la pérdida de la isoforma 1 de la kinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK; *myosin light chain kinase isoform 1*), enzima requerida para el correcto funcionamiento de la CTE, provoca un aumento de los niveles de mROS, lo que provoca un efecto protector en la célula, a través de la inducción de vías de respuesta al estrés, entre las cuales podemos encontrar a Nrf2 (Lapointe et al., 2009). Recientemente, también se ha observado que el uso de elevadas dosis de antioxidantes sintéticos que provocan

un descenso global de ROS induce un envejecimiento celular prematuro (Kornienko et al., 2019; Li et al., 2018).

5.6 Las ROS mitocondriales y su función en el metabolismo celular y el comportamiento cerebral

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado la importancia que tienen las mROS modulando el metabolismo y el comportamiento en el ratón. Este trabajo demuestra que las mROS endógenos astrocíticos tienen una relevancia funcional que garantiza la correcta cooperación metabólica entre astrocitos y neuronas, necesaria para la bioenergética y la supervivencia neuronal (Vicente-Gutiérrez et al., 2019). Concretamente se pone de manifiesto que las mROS en los astrocitos tienen un efecto inhibitorio en la vía de la pentosa fosfato, vía involucrada en la generación de poder reductor y en la producción de NADPH. Los resultados también indican que las mROS están involucradas en la regulación de otras dos vías de señalización: HDAC4 y NRF2. La oxidación de HDAC4 por mROS activaría la expresión de miR-206, reprimiendo la expresión de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), un componente de la PPP. Por otro lado, también se ha observado que las mROS mantienen activo Nrf2, contribuyendo de esta manera a la regeneración de GSH neuronal. Esto es de vital importancia para mantener el equilibrio redox en las neuronas, evitando de esta manera las posibles afectaciones en la función neuronal.

Cabe destacar que la abundancia de mROS en condiciones fisiológicas es considerablemente más alta en astrocitos que en neuronas, por lo que es concebible especular que cualquier reducción en mROS tendría un mayor impacto en el metabolismo de los astrocitos. Sin embargo, bajo una condición patológica, como

es el tratamiento con ácido 3-nitropropiónico (3-NP) se, se ha demostrado que las mROS, que contribuyen al daño cerebral y la descoordinación motora son de origen neuronal, no astrocítico. Este hecho pone en evidencia la importancia de dirigirse a tipos de células específicos a la hora de abordar las consecuencias que tiene la modulación de la homeostasis redox del cerebro en condiciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas (Vicente-Gutiérrez et al., 2021).

6. NEUROGÉNESIS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

La neurogénesis es un proceso complejo que involucra diversas etapas, como es la proliferación de las células pluripotenciales, la migración, la diferenciación, la supervivencia de las neuronas nuevas, así como la integración de éstas en los circuitos neuronales existentes (Kawabe and Brose, 2011). Por tanto, este proceso puede definirse, de forma resumida, como la generación de nuevas neuronas, tanto en el embrión en desarrollo como en el adulto (Eriksson et al., 2019).

6.1 Formación del tubo neural

El sistema nervioso central se origina a partir de la línea media del ectodermo dorsal embrionario. La notocorda, que es de origen mesodérmico, emite señales inductoras que inician la formación del tubo neural. La región medial y dorsal del ectodermo, conocida como placa neural, se invagina y pliega hasta fusionar sus extremos dorsales, formando el tubo neural. Las paredes interiores de este tubo proliferan y migran para dar origen a todas las estructuras del (SNC) en un proceso denominado neurulación (Squire et ál., 2008).

La primitiva luz del tubo neural es el origen de las cavidades del sistema ventricular del SNC, a la vez que las células neuroepiteliales del tubo darán lugar

a todas las células del SNC, como las neuronas y las células gliales (Squire et al., 2003). Sin embargo, otros elementos del SNC, como la microglía y los vasos sanguíneos, tienen un origen mesodérmico. La producción, diferenciación y muerte de las células del SNC se rigen por un programa complejo en el que intervienen diferentes factores tanto internos como externos. Entre estos factores, encontramos a Sonic hedgehog (SHH), las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y los genes selectores homeóticos *Hox*, los cuales, durante el desarrollo embrionario, son los responsables de coordinar la organización de las distintas estructuras y de los ejes dorso-ventral y antero-posterior del tubo neural (Di Bella et al., 2021; Rodrigues et al., 2017).

6.2 Desarrollo de la corteza cerebral

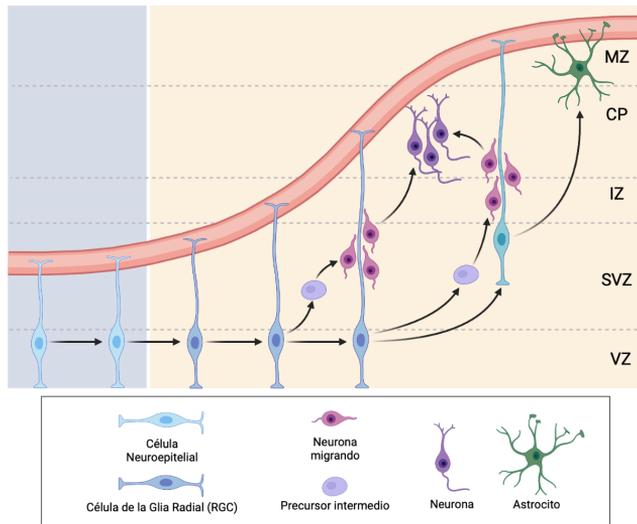
Una de las regiones que se forma durante esta etapa embrionaria es la corteza cerebral. En las fases iniciales del desarrollo, la corteza cerebral está formada por un epitelio donde se encuentran las células neuroepiteliales (NEC) (**Esquema 5**).

Las NEC se caracterizan por ser alargadas y bipolares, y se organizan en una capa pseudoestratificada que se extiende desde el ventrículo hasta la superficie pial. En una primera fase, estas células proliferan y se acumulan dentro de la zona ventricular (VZ) y en una segunda fase en la zona subventricular (SVZ) (Agirman et al., 2017).

Posteriormente, las NEC se transforman en células de la glía radial (RGC; *radial glial cells*), que expresan marcadores astrogliales, como son el transportador de Glutamato y aspartato (GLAST; *Glutamate Aspartate Transporter*), la proteína de unión a lípidos (BLBP; *Brain Lipid Binding Protein*), el antígeno RC2, la troponina C, así como una variedad de filamentos intermedios como Nestina y

Vimentina. Las RGC se encuentran en la VZ, son las NPCs primarias y comparten una estructura bipolar similar a las células neuroepiteliales, con una prolongación basal que se conecta con la superficie pial y una prolongación apical con un cilio corto que se extiende hacia el ventrículo (Cameron and Rakic, 1991).

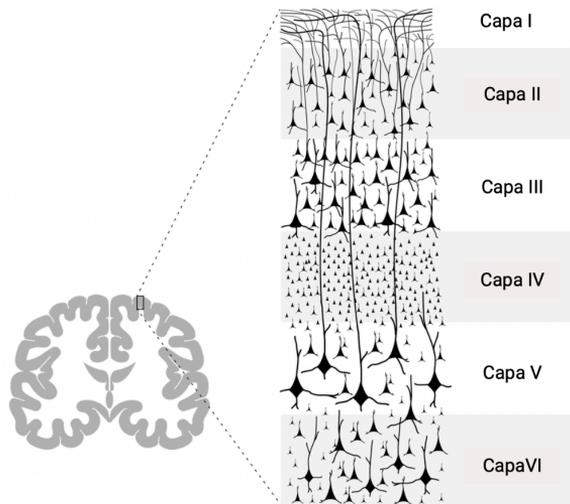
Inicialmente, se pensaba que la función principal de estas RGC era servir como sustrato y guía para la migración de los neuroblastos generados durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, se ha demostrado que también actúan como células madre neurales durante la neurogénesis cortical. En estadios iniciales, las divisiones de las RGC suelen ser simétricas, renovando así las propias RGC. Cuando avanza la neurogénesis las divisiones son asimétricas y dan lugar a una RGC y a una célula hija que, bien migrará radialmente hacia la superficie y se diferenciará a una neurona, o bien migrará a la SVZ para dar lugar a un progenitor intermedio, también llamado progenitor basal intermedio. Además, en la VZ existe otro tipo de célula progenitora, los denominados precursores neurales breves, con un ciclo celular más corto que las RGC con quienes coexiste, pero que no poseen capacidad de autorrenovación y solo son capaces de generar pares de neuronas por medio de divisiones simétricas (Gal et al., 2006; Di Bella et al., 2021). Las primeras neuronas postmitóticas producidas directa o indirectamente a partir de las RGC se someten a un proceso de migración complejo y temporalmente regulado para llegar a la placa cortical (CP). Estas neuronas irán ocupando la posición correcta para formar las diferentes capas de la corteza cerebral, siguiendo el proceso de migración conocido como de, dentro hacia afuera, siendo las capas internas las más ancestrales y las superficiales las más recientes (Di Bella et al., 2021).



Esquema 5. Representación de la neurogénesis de la corteza cerebral. Las distintas fases del desarrollo durante la etapa embrionaria: proliferación, migración, diferenciación y maduración. VZ (Zona ventricular), SVZ (Zona subventricular), CP (Placa cortical), IZ (Interzona), MZ (zona marginal).

6.3 Estructura de la corteza cerebral

La corteza cerebral en los mamíferos, incluyendo a los humanos y los ratones, se caracteriza por tener una estructura laminar compuesta por seis capas distintas (**Esquema 6**). Estas capas suelen denominarse utilizando números romanos: Capa molecular (I), Capa granular externa (II), Capa piramidal externa (III), Capa granular interna (IV), Capa piramidal interna o ganglionar (V), Capa multiforme o de células polimórficas (VI). Es importante tener en cuenta que, si bien esta estructura de seis capas es característica de la corteza cerebral en general, existen variaciones en el grosor y desarrollo de ciertas áreas en diferentes especies, lo cual refleja la complejidad y evolución específica de cada organismo (Stepien et al., 2021).



Esquema 6. Capas de la corteza cerebral de mamífero adulto. Capa molecular (I), Capa granular externa (II), Capa piramidal externa (III), Capa granular interna (IV), Capa piramidal interna o ganglionar (V), Capa multiforme o de células polimórficas (VI).

En el ratón, objeto de la presente Tesis doctoral, la mayoría de las neuronas corticales se generan entre los días embrionarios 12,5 y 17,5 (*post-coitum*) (Urbán, 2014), requiriendo un número total estimado de 11 ciclos celulares durante la neurogénesis. Funcionalmente, la corteza comprende cuatro tipos de células neurales que incluyen dos clases de neuronas, piramidales glutamatérgicas e interneuronas GABAérgicas, así como dos tipos de células gliales, oligodendrocitos y astrocitos.

6.4 Factores reguladores de la neurogénesis cortical

Durante el desarrollo cortical, hay diversos factores reguladores que controlan diferentes aspectos del proceso, incluyendo la migración celular, la laminación y la formación de las capas corticales:

1. **Pax6**. Es un factor de transcripción esencial en el desarrollo cortical. Su delección o mutación causa defectos cerebrales y alteraciones en el neurodesarrollo. Pax6 se expresa en los progenitores de la zona ventricular, regula la proliferación de estos y controla la duración del ciclo celular. Además, juega un papel en la determinación del destino neuronal de los progenitores corticales (Zhang et al., 2011).
2. **Tbr2** (*T-box brain protein 2*). Este factor de transcripción se expresa en los progenitores intermedios basales. La pérdida de Tbr2 conduce a la disminución del grosor de las capas corticales y la pérdida de progenitores intermedios, mientras que su sobreexpresión aumenta la proliferación de los progenitores intermedios basales (Sessa et al., 2008).
3. **Neurogeninas 1 y 2** (Ngn1 y Ngn2). Estos factores proneurales desempeñan un papel en la especificación del destino neuronal de los progenitores. Durante la neurogénesis, entre E12-E15 en el ratón, los niveles de expresión de Ngn1 permanecen elevados, mientras que están muy reducidos durante la astrogliogénesis, en los días posnatales P0-P4 (Sun et al., 2001; He et al., 2005).
4. **p27kip1**. Es una proteína inhibidora de las quinasas dependientes de ciclina que regula la progresión del ciclo celular. Controla la proporción de células que salen del ciclo celular y migran a las capas corticales superiores. Además, interactúa con Ngn2 para regular la activación de genes diana y promueve la migración y la morfología de las neuronas postmitóticas (Bach et al., 2018; Ray et al., 2009).

6.5 ROS en el desarrollo del sistema nervioso central

Como hemos detallado previamente en el apartado 1, las ROS desempeñan un papel importante en la señalización celular y en el control de varios procesos celulares (Oswald et al., 2018; Wilson et al., 2018; Sies et al., 2022; Bigarella et al., 2014; Kanda et al., 2011; Ray et al., 2012). Estas ROS pueden modular la actividad de las principales vías de señalización involucradas en el desarrollo, incluidas aquellas que están mediadas por factores de transcripción, factores de crecimiento y morfógenos, ya que estos pueden oxidar o modificar directamente proteínas y enzimas, lo que provoca cambios en su actividad y función (Wilson et al., 2018; Sies et al., 2022). Además, son capaces de modular la actividad de las moléculas de señalización, como las proteínas quinasas y las fosfatasas, al oxidar o reducir sus residuos de cisteína (Rhee, 2016).

Numerosos estudios han sugerido que el estrés oxidativo desempeña un papel en la regulación del comportamiento de las NPCs y la neurogénesis cortical, regulando los diferentes procesos clave en el desarrollo del cerebro (Chui et al., 2020). Las ROS son esenciales para la proliferación de las NPCs, ya que niveles moderados de éstas promueven la proliferación de células progenitoras neurales, siendo las responsables de generar nuevas neuronas en la corteza en desarrollo (Chui et al., 2020). Además, se ha identificado que las ROS puede activar vías de señalización involucradas en la progresión del ciclo celular y promover la división celular. Un claro ejemplo de este mecanismo es el observado en el trabajo de Kirova (Kirova et al., 2022), que demuestra que las mROS aumentan durante el ciclo celular y oxidan la quinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2), permitiendo su interacción con la fosfatasa KAP, promoviendo de esta manera la replicación y proliferación del ADN.

Junto a estos resultados, se ha puesto de manifiesto que las ROS que se generan por las NOX, participan en los procesos de diferenciación neuronal, tanto en las etapas embrionarias como adultas. Esta generación de ROS mediada por NOX se produce a través de la activación de las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/Erk (Terzi et al., 2018). Todo parece indicar que las principales isoformas que modulan el desarrollo neuronal son NOX2 y NOX4, desempeñando una importante función en el crecimiento dendrítico y axonal. En este contexto, las ROS estarían modulando el crecimiento y la orientación axonal, mediante la oxidación de proteínas del citoesqueleto asociadas a la actina (Wilson et al., 2018). Además de las NOX, existen otras moléculas implicadas en la señalización de las ROS durante el desarrollo axónico, como es la flavoenzima, MICAL, que vincula a las ROS con el crecimiento del cono axónico, a través de la semaforina 3A (Sema3A) (Hung et al., 2010).

Recientemente, se ha identificado que la maduración neural es el resultado de la existencia de un patrón temporal del desarrollo mitocondrial y metabólico (Itawa et al., 2023). Así, se ha identificado que las diferencias en las propiedades metabólicas específicas de las neuronas corticales pueden influir en la neurogénesis humana (Goval et al., 2014). Durante mucho tiempo se ha pensado que la glucólisis aeróbica constituye un sello distintivo de la proliferación celular, así como durante de la tumorigénesis (Vander Heider et al., 2009). No obstante, investigaciones recientes han encontrado que la actividad de la OXPHOS mitocondrial influye en la velocidad del desarrollo morfológico y funcional de la neurona posmitótica (Itawa et al., 2023).

6.6 Modelo de estudio del desarrollo del cerebro: Neuroesferas

El cultivo de neuroesferas se describió por primera vez en 1992 (Reynolds and Weiss, 1992) y sigue siendo, actualmente, una herramienta importante en la investigación de NPCs, representando un método *in vitro* para el estudio del desarrollo del cerebro (Azari et al., 2016). Las neuroesferas utilizan un medio de cultivo químicamente definido y libre de suero, que contiene factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Estos factores de crecimiento promueven la proliferación de las NPCs (Vescovi et al., 1993). En este tipo de ensayo, las NPCs crecen en forma de neuroesferas, que pueden ser pasadas a cultivos sucesivos para expandir la reserva de células. Estos progenitores del tallo neural son multipotentes, lo que significa que tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, los principales tipos de células del SNC (Walker and Kepperman, 2014).

Este tipo de cultivo proporciona una fuente renovable de precursores indiferenciados del SNC, lo que permite estudiar procesos como la proliferación, la autorrenovación y la diferenciación neuronal y glial, en condiciones fisiológicas y patológicas. Además, estos sistemas permiten evaluar la especificación intrínseca de los precursores neurales durante el desarrollo y explorar el potencial de las células al eliminar las señales extrínsecas del entorno normal. Estas ventajas han hecho que el cultivo de neuroesferas sea ampliamente utilizada por muchos investigadores, tanto en el campo de la neurociencia como en el de la medicina regenerativa (Jensen and Parmar, 2006).

Hipótesis y objetivos

1. HIPÓTESIS

Históricamente, las especies reactivas de oxígeno se han considerado moléculas relacionadas con el desarrollo de procesos fisiopatológicos. Esto se debe a que su toxicidad resulta especialmente relevante cuando su concentración intracelular alcanza valores elevados, capaces de superar la defensa antioxidante y detoxificante celular, lo que provoca estrés oxidativo. No obstante, las ROS también desempeñan importantes funciones fisiológicas, ya que actúan como segundos mensajeros capaces de regular procesos celulares tan importantes, como son la proliferación, la diferenciación, la migración y la apoptosis, entre otros, que son claves para el desarrollo del sistema nervioso central.

Mediante la manipulación exógena del estado redox celular, se ha demostrado que las ROS desempeñan un papel fundamental en la regulación de la autorrenovación de las células madre neurales, su maduración y transición hacia su diferenciación a neuronas (Hwang, 2021). Sin embargo, se desconoce la implicación de los ROS mitocondriales endógenos en estos procesos. Recientemente, se ha demostrado que la modulación de los ROS astrocíticos, promueve cambios metabólicos que regulan la función neuronal (Vicente-Gutierrez et al., 2019). En este contexto, creemos que las ROS mitocondriales podrían tener una importante función en el control de la transición de la proliferación a la diferenciación de los progenitores neurales y, por ende, en el desarrollo perinatal de la corteza cerebral.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta nuestra hipótesis, nuestro objetivo fundamental ha sido investigar la posible función de las especies reactivas de oxígenos generadas en la mitocondria sobre la transición de la proliferación a la diferenciación de los precursores neurales, haciendo hincapié en su efecto sobre el desarrollo de la corteza cerebral.

En concreto, proponemos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la función de las ROS mitocondriales (mROS) en la diferenciación y actividad de las neuronas corticales neuronal en cultivo primario.
2. Estudiar el efecto de las mROS en los procesos de proliferación y diferenciación de los precursores neurales durante el desarrollo de la corteza cerebral en ratón.
3. Identificar los mecanismos moleculares implicados en la función de las mROS sobre la proliferación y diferenciación de los progenitores neurales, en un modelo de neuroesferas en cultivo.

Material y métodos

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

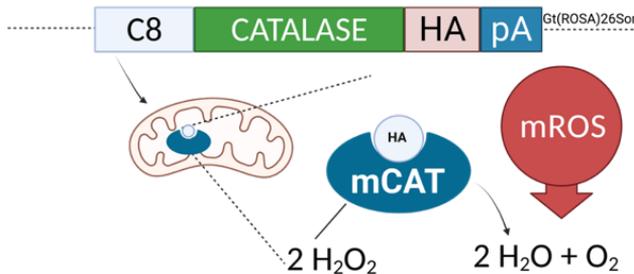
Todos los procedimientos con animales cumplen la recomendación 2007/526/EC, de 18 de junio de 2007, de la Comisión Europea relativa al alojamiento y cuidado de animales, así como la legislación española vigente RD53/2013, de 1 de febrero de 2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. Además, todos los protocolos de la presente Tesis que implican manejo de animales vivos han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

Los animales se criaron en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca, manteniendo un ciclo de luz-oscuridad durante 12 horas. La humedad estuvo entre 45 % y 65 % y la temperatura entre 20 °C y 25 °C. Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta sólida estándar con acceso libre de agua. El periodo gestacional, establecido en 19,5 días para el ratón, se controló limitando la cohabitación de ratones hembra con machos a una noche. A las 9:00 horas del día siguiente, se aislaron hembras con presencia de espermatozoides en el frotis vaginal acompañados por células epiteliales de la vagina y se consideró este día como el primero de la etapa gestacional.

1.1 Modelo de ratón mCAT

En el desarrollo de este trabajo se ha empleado un modelo de ratón knock-in que expresa la catalasa mitocondrial de forma constitutiva (mCAT), lo que permite modular a la baja la abundancia de las mROS endógenos.

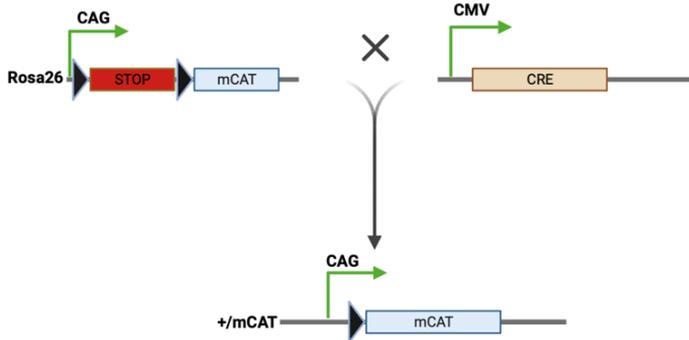
El modelo transgénico, descrito en el **Esquema 7**, se generó a partir de cDNA mCAT, que codifica la catalasa fusionada a la secuencia N-terminal de localización mitocondrial de la citocromo c oxidasa VIII (C8) y la secuencia de cDNA de la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza para su seguimiento. El cDNA mCAT se introdujo mediante recombinación homóloga en el locus Rosa26 en un fondo C57Bl/6J genOway, France). De este modo se aseguró (i) la inserción de una única copia de la construcción mCAT en un locus determinado, (ii) la expresión controlada de la construcción mCAT y (iii) el mantenimiento de la catalasa endógeno (citoplásmica) intacta.



Esquema 7. Construcción de la catalasa mitocondrial. C8: citocromo c oxidasa VIII; HA: hemaglutinina de influenzahumana; pA: cola poli-A; mCAT: catalasa mitocondrial; mROS: especies reactivas de oxígeno mitocondriales.

Adicionalmente, se incluyó una secuencia de parada (STOP) flanqueada por secuencias LoxP (5'-ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT-3') (*Locus of X-over P1*) (Branda Aand Dymecki, 2004) entre el cDNA de la catalasa mitocondrial y el promotor CAG, lo que permitiría expresar la catalasa mitocondrial de forma tejido-específica o en un tiempo concreto. El ratón generado de esta manera (+/mCATLoxP) con fondo C57Bl/6J, se cruzó con ratones que expresan Cre recombinasa derivada del fago P1 bajo el promotor CMV (+/CMV-Cre) para eliminar la secuencia de STOP y expresar la catalasa

mitocondrial de forma constitutiva (+/mCAT) (**Esquema 8**). Para la realización de los experimentos incluidos en la presente Tesis, se cruzaron animales heterocigotos (+/mCAT) con ratones C57Bl/6J para la obtención de los animales +/mCAT (mCAT) y +/+ (wt).



Esquema 8. Estrategia utilizada para expresar de manera ubicua la catalasa en la mitocondria. CAG: potenciador del citomegalovirus fusionado con el protomot de la actina b de pollo; CRE: Cre Recombinasa; mCAT: catalasa mitocondrial; CMV: citomegalovirus.

1.2 Extracción de ADN

El ADN se extrajo de un pequeño fragmento de la cola o del cerebelo de ratones a diferentes estadios del desarrollo, embrionarios y postnatales. El tejido se incubó con 200 μ l de tampón de lisis (buffer TEN: Tris 50 mM pH 7,5, EDTA 5 mM pH 8, NaCl 100 mM, que contiene DTT 1 mM y espermidina 0,5 mM) y 5 μ l de proteinasa K (800 U/ μ l; Sigma-Aldrich). Para su digestión completa la reacción se mantuvo en agitación durante toda la noche a 55 $^{\circ}$ C. Al día siguiente las muestras se incubaron durante 5 minutos a 100 $^{\circ}$ C, para inactivar la proteinasa K y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos.

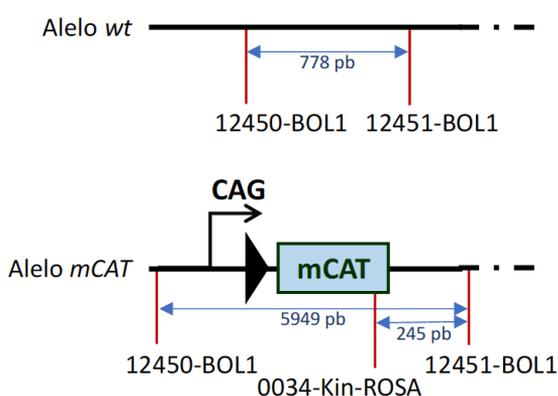
1.3 Genotipado de los animales

Los ratones se genotiparon mediante PCR:

Los ratones mCAT se genotiparon mediante PCR y se utilizaron las siguientes secuencias de oligonucleótidos:

<i>OLIGONUCLEÓTIDOS</i>	<i>SECUENCIA</i>
<i>BOL1 (FORWARD)</i>	5'CTCCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATAT-3'
<i>BOL1 (REVERSE)</i>	5'CGATTTGTACGTA ACTAATCTGTCTGG-3'
<i>Kin-ROSA</i>	5'GCAGTGAGAAGAGTACCACCATGAGTCC-3'

Los oligonucleótidos BOL1(F) y BOL1(R) generan una banda de 778 pb en el alelo silvestre (wt) y una de 5949 pb en el alelo mCAT, difícil de detectar por su gran tamaño. Para detectar la construcción de mCAT, se utilizó el tercer oligonucleótido Kin-ROSA que generó una banda de 245 pb (**Esquema 9**).



Esquema 9. Estrategia de genotipado de animales mCAT mediante el análisis de PCR. Las líneas rojas ilustran la localización de los oligonucleótidos.

Las condiciones de la PCR fueron: 5 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C seguidos de 30 segundos a 65 °C y 3 minutos a 72 °C y un paso final de 8 minutos a 72 °C. Las concentraciones finales de los componentes de la PCR fueron una mezcla de dNTPs 0,5 mM (Roche), oligonucleótidos 0,3 μM (Sigma-Aldrich), Taq polimerasa 0.042 U/μl (Biotools) y un tampón de reacción 10X que contiene MgCl₂. La cantidad total de DNA empleado fue de 30 ng.

1.4 Electroforesis en gel de Agarosa

Los productos de la PCR se analizaron mediante un gel de agarosa al 3 % (p/v). Los geles se tiñeron previamente con MidoriGreen (1:20.000) y la electroforesis se realizó en tampón TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, NaEDTA•2H₂O 1mM), usando un colorante 6X (Tris 10 mM pH 7,6, azul de bromofenol 0,03 % (v/v), xileno cianol 0,03 %, glicerol 60 %, Na₂EDTA•2H₂O 60 mM) para cargar el ADN. Las imágenes se realizaron usando el equipo Bio-Rad Chemidoc (XRS).

2. CULTIVOS CELULARES

2.1 Cultivo primario de neuronas corticales

Para la obtención del cultivo primario de neuronas corticales *wild type* (wt) y mCAT, emplearon camadas de embriones de 14,5 días de gestación (Gómez-Sánchez et al., 2011; Delgado Esteban M et al, 2013), procedentes de la línea de animales, que hemos denominado como mCAT constitutiva y en un fondo

genético C57Bl/6J. Las ratonas gestantes se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajeron los embriones mediante histerectomía. Con ayuda de tijeras, forceps y pañuelos impregnados en 70 % de etanol, se extrajeron los hemisferios cerebrales de forma individualizada para cada embrión. A continuación, se colocaron en una placa Petri de poliestireno con la solución de disgregación [EBSS o Solución basal salina de Eagle (*Eagle's Basal Salt Solution*: NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, NaH₂PO₄ 1,01 mM, MgSO₄ 1,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, D-glucosa 4 mM, 10 mg/ml de rojo fenol) con 2,94 mg/ml de BSA (albúmina de suero bovino) y 20 µg/ml de DNAsa tipo I, (pH 7,15) y se diseccionaron suavemente con un bisturí. A continuación, se colocó cada cerebro de embrión diseccionado en un eppendorf y se dejó durante 4 minutos hasta su sedimentación. Cada uno de los sedimentos se resuspendió en 1 ml de solución de tripsinización (EBSS; 50 µg/ml de ADNsa, 3,15 mg/ml de BSA, 10 mg/ml de tripsina, pH 7,15) y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos en un baño termostático. La tripsinización se detuvo añadiendo FBS (suero fetal de ternera, *fetal bovine serum*) a una concentración final de 10 % (v/v). La suspensión celular se centrifugó a 500 X g durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante (Eppendorf 5702R). Los sedimentos se resuspendieron suavemente (9 veces cada uno) en 1 ml de solución de disgregación (EBSS: 50 µg/ml de ADNsa, 3,15 mg/ml de BSA, 10 mg/ml de tripsina, pH 7,15) y con ayuda de una pipeta Pasteur siliconada para evitar la rotura celular. Tras dejar sedimentar la solución celular durante 4 minutos, se recogió el sobrenadante, que contenía las células disociadas, y se depositó en un tubo limpio. Este proceso de resuspensión se repitió una vez más para aumentar el rendimiento. Los sobrenadantes se centrifugaron luego a 500 X g durante 5 minutos.

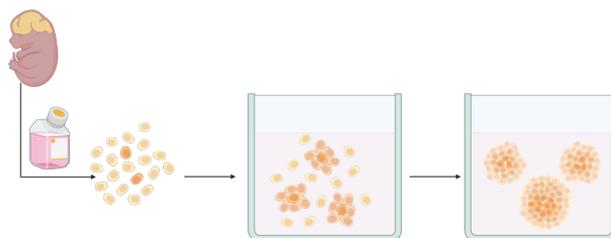
Los sedimentos celulares se resuspendieron en un medio específico para el crecimiento neuronal Neurobasal-A (Life Technologies, Gibco) suplementado con

2 % de B27-AO (AntiOxidants, Life Technologies, Gibco), L-glutamina 2 mM, D-glucosa 5,5 mM, piruvato 2,5 mM y una mezcla de antibióticos: penicilina G 100 U/, estreptomina 100 µg/l y anfotericina B 0,25 µg/l (Sigma-Aldrich). Además, para prevenir la posible contaminación por micoplasma se realizó un tratamiento con Plasmocina 2,5 µg/ml (Invivo Gen). El recuento de células vivas se realizó con una tinción de 0,4 % de azul de tripano (10 µl de la suspensión celular en 30 µl medio de cultivo y 40 µl de azul de tripano) (Sigma-Aldrich), y se utilizó una cámara Neubauer (Zeiss) y un microscopio de contraste de fases (Olympus CK30). La suspensión celular se sembró a una densidad de 18×10^4 células/cm² en placas de poliestireno (Nunc™, Thermo Fischer Scientific), previamente recubiertas con poli-D lisina (10 µg/ml; Sigma-Aldrich) o con poli-L ornitina 15 µg/ml (Sigma-Aldrich) y fibronectina 1 µg/ml (Sigma-Aldrich). Las placas se colocaron en un incubador de cultivo celular termostatzado a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂. El medio se renovó cada 3 días in vitro (DIV). Las neuronas se utilizaron a diferentes días de diferenciación, recogándose a tiempos cortos (1-6 DIV) y tiempos más largos (9-12 DIV).

2.2 Cultivo de neuroesferas

Las neuroesferas se obtuvieron de los hemisferios corticales de camadas de embriones de 14,5 días de gestación (E14,5) procedentes de la línea mCAT constitutiva con fondo genético C57Bl/J6 (Vicente-Gutiérrez et al., 2019). El procedimiento para la obtención de la suspensión celular se realizó de manera similar al que se utilizó en el cultivo primario de neuronas corticales descrito en el apartado anterior.

En este caso, el sedimento celular que se obtuvo al final, se resuspendió en un medio específico para el crecimiento de neuroesferas DMEM/F12 (17,5 mM glucosa, Gibco Life Technologies) suplementado con 2 % de B27-sin vitamina A (AntiOxidants, Life Technologies, Gibco), L-glutamina 10 mM, piruvato 10mM y antibióticos: penicilina G 100 U/l; estreptomicina 100 µg/l; anfotericina B 0,25 µg/l (Sigma-Aldrich) y suplemento N2 (Gibco) (Belenguer et al., 2017). Igualmente, para prevenir contaminación por micoplasma se realizó un tratamiento con Plasmocina 2,5 µg/ml (Invivo Gen). El recuento de células vivas se realizó con la tinción con azul de tripano al 0,4 % (10 µl de la suspensión celular en 30 µl medio de cultivo y 40 µl de azul de tripano) (Sigma-Aldrich), y se utilizó una cámara Neubauer (Zeiss) y un microscopio de contraste de fases (Olympus CK30). La suspensión celular se sembró a una densidad de 20-25 x10³ células/cm² en placas de poliestireno (NuncTM, Thermo Fischer Scientific) sin tratamiento previo y en presencia de dos mitógenos: bFGF 20 ng/ml (basic Fibroblast Growth Factor, Sigma) y EGF 20 ng/ml (*Epidermal Growth Factor*, Gibco Life Technologies) (Cha et al., 2017). Las placas se colocaron en un incubador de cultivo celular termostatzado a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂ durante 6 días (**Esquema 10**).



Esquema 10. Realización del cultivo de neuroesferas primarias corticales. Las células de los hemisferios corticales se disociaron y se cultivaron con DMEM/F12 suplementado con mitógenos. Éstas se mantuvieron hasta los 6 días en un incubador de cultivo celular termostatzado a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂.

3. EXTRACCIÓN DE MITOCONDRIAS DE LAS NEUROFERAS

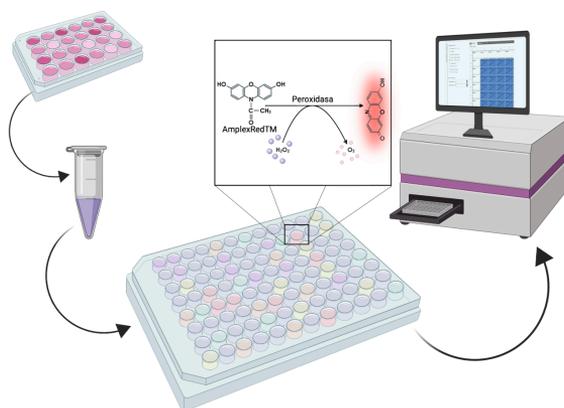
Las neuroesferas de 6 DIV cultivadas en placas de 60 cm² se disgregaron con acutasa (Accutase®, Cell detachment solution, Stem Cell) y se centrifugaron a 500 X g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 500 µl de Tampón A (sacarosa 83 mM, MOPS 10 mM (3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico, pH 7,2). Este sedimento se homogeneizó 20 veces con un Potter-Elvehjem. El mismo volumen de Tampón B (250 mM sacarosa, 30 mM MOPS, pH 7,2) se añadió a la muestra y el homogeneizado se centrifugó a 1.000 g durante 5 min para eliminar las células y los núcleos intactos. El sobrenadante se recogió en otro tubo y se centrifugó a 12.000 g durante 2 min y se obtuvo el pellet que contiene la fracción mitocondrial. Este pellet se lavó en 200 µl de Tampón C (sacarosa 320 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4) y se volvió a centrifugar 12.000 X g durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento, que contenía las mitocondrias lavadas, se resuspendió en 80 µl de Buffer D (1 M 6- ácido aminohexanoico, Bis-Tris HCl 50 mM, pH 7,0). Finalmente, se midieron las concentraciones de mitocondria para realizar los experimentos posteriores.

4. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

4.1 Determinación de peróxido de hidrógeno

La producción de H₂O₂ celular se detectó con la sonda luminiscente AmplexRed™ (Molecular Probes. Invitrogen) (López-Fabuel et al., 2016). En presencia de la peroxidasa de rábano, la sonda (10-acetil-3,7dihidroxifenoxacina)

reacciona estequiométricamente (1:1) con H_2O_2 , originando resorufina, un compuesto oxidado fluorescente ($\lambda_{exc} \sim 571 \text{ nm}$; $\lambda_{em} \sim 585 \text{ nm}$), que puede ser detectado por espectrofluorimetría (**Esquema 11**). Para la determinación de H_2O_2 las células o las mitocondrias aisladas (5 ug) se incubaron con el reactivo AmplexRed™ 100 μM en tampón KRPG (Krebs-Ringer Phosphate Glucose, NaCl 145 mM, Na_2PO_4 5,7 mM, KCl 4,86 mM, $CaCl_2$ 0,54 mM, $MgSO_4$ 1,22 mM y D-glucosa 5,5 mM, pH 7,35) en presencia de peroxidasa de rábano (0.1 U/ml) durante 2 horas a 37 grados. Cada 15 minutos se anotó la luminiscencia emitida a una longitud de onda de 604 nm, siendo la longitud de excitación de 538 nm, con una duración de 2 horas y utilizando un espectrofotómetro Varioskan Flash (Thermo Fischer). Para calcular la velocidad de producción de H_2O_2 , las pendientes derivadas de la fluorescencia emitida por la sonda se normalizaron con la concentración de proteínas en cada condición (pmol/h/ μg proteína). Una alícuota de la misma suspensión celular se recogió en NaOH para la determinación de la concentración de proteínas. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias respecto a la condición control.

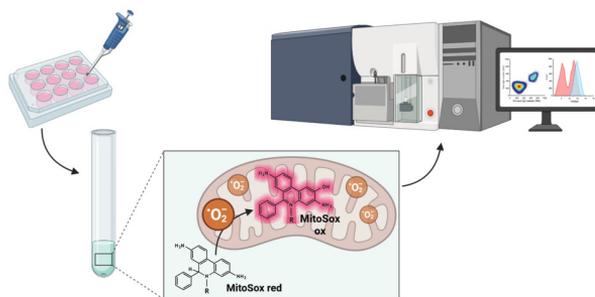


Esquema 11. Detección de H_2O_2 mediante el uso de la sonda AmplexRed™. La sonda se oxida en presencia de H_2O_2 por acción de la peroxidasa, dando lugar a resorufina un compuesto detectable fluorimétricamente.

4.2 Determinación de anión superóxido

La determinación de los niveles de $O_2^{\cdot -}$ que se producen a nivel de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, se realizó utilizando la sonda comercial MitoSOX™ Red (Invitrogen™ Molecular Probes™, Thermo Fisher Scientific, Ref. M36008). Este reactivo es permeable a las células vivas y contiene un grupo catiónico (carga positiva) que lo dirige selectivamente a las mitocondrias (Quintana Cabrera et al., 2012). En el interior de estos orgánulos, el indicador MitoSOX™ se oxida por la acción del $O_2^{\cdot -}$, pero no por otras especies de oxígeno y/o nitrógeno (**Esquema 12**).

Las neuroesferas una vez recogidas y disgregadas con acutasa (Accutasa®; Cell detachment solution, Stem Cell), se lavaron con tampón fosfato salino (PBS: NaCl 136 mM; KCl 2,7 mM; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 7,8 mM; KH_2PO_4 1,7 mM; pH 7,4) y se incubaron en presencia de la sonda MitoSOX™ 2 μ M en tampón KRPG durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente las células se centrifugaron (5 minutos a 500 x g) y se resuspendieron en PBS.



Esquema 12. *Detección de $O_2^{\cdot -}$ mediante el uso de la sonda MitoSOX™. La oxidación de la sonda en la mitocondria da lugar a un derivado fluorescente que permite la detección de $O_2^{\cdot -}$ de manera específica en el orgánulo.*

La señal de la sonda se analizó en el canal de FL4 de un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences), equipado con un haz láser de argón de 15 mW sintonizado a 510 nm (Mukhopadhyay et al., 2007). Se utilizaron los programas CellQuest™ para la adquisición de eventos y Paint-A-Gate™ PRO para el análisis. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias.

4.3 Determinación de anión superóxido extracelular

La producción de $O_2^{\cdot-}$ extracelular se midió siguiendo un protocolo publicado previamente (Li et al., 2016) con algunas modificaciones. Este método se basa en la reducción del citocromo C oxidado (Cyt C) a su forma reducida por el $O_2^{\cdot-}$ (Bayard and Arnal, 2000). El Cyt C reducido absorbe luz a 550 nm y el valor de absorbancia es directamente proporcional a su concentración. Para determinar la producción de $O_2^{\cdot-}$ extracelular, las neuroesferas una vez disgregadas y lavadas se pipetearon en una placa de 96 pocillos y se incubaron con Cyt C oxidado 120 μ M (Sigma-Aldrich), durante 2 horas a 37 °C. Se registró la absorbancia a 550 nm usando un Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher). La concentración de $O_2^{\cdot-}$ se calculó usando el coeficiente de extinción de la forma reducida de Cyt C y se normalizó a la cantidad de proteína. Los resultados se expresan como μ M por mg de proteína.

5. DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

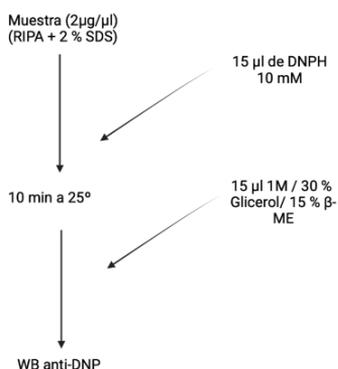
La muerte celular por apoptosis se determinó mediante citometría de flujo tras teñir las células con anexina V conjugada con DY634 (Immunostep) y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences). El método se basa en la detección de

la fosfatidilserina, un fosfolípido presente en las membranas plasmáticas y que en las células apoptóticas se transloca del interior al exterior de la membrana plasmática. La anexina V es una proteína anticoagulante vascular que posee una gran afinidad por la fosfatidilserina. Por ello, unida a un fluorocromo adecuado, permite la identificación de las células apoptóticas tras su unión a dicho fosfolípido localizado en su superficie celular. Sin embargo, la anexina V también es capaz de unirse a la fosfatidilserina en el interior de células necróticas que han perdido su integridad de membrana. Para evitar falsos positivos, además de anexina V-APC, se utilizó 7-AAD, un colorante que se une específicamente al DNA de las células necróticas. De este modo, solo aquellas células positivas para la anexina V, que mostraron ser negativas para el 7-AAD, se consideraron apoptóticas (Almeida et al., 2004; Delgado-Esteban et al., 2013; Sánchez-Moran et al., 2020).

Las neuroesferas se recolectaron y se disgregaron con la acutasa. Posteriormente, se centrifugaron 5 min a 500 X g y se resuspendieron en tampón BB (*Binding Buffer*, Hepes 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM; a pH 7,4) y se incubaron con Anexina-V DY64 y 7-AAD durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la incubación se añadió buffer (BB) suficiente para conseguir una concentración celular aproximadamente de 10⁶ células/ml. En el análisis por citometría se registraron 50.000 eventos para cada triplicado de cada condición. Las señales de la anexina V y del 7-AAD se analizaron en los canales FL4 y FL3, respectivamente, de un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences), equipado con un haz láser de argón de 15mW sintonizado a 488 nm. Se utilizaron los programas CellQuest™ para adquisición de eventos y Paint-A-Gate™ PRO para el análisis de estos (BD Biosciences). Los resultados se expresaron como porcentaje de neuronas apoptóticas positivas para Anexina V y negativas para 7AAD (anexina V-APC⁺/7AAD⁻).

6. DETERMINACIÓN DEL ESTADO OXIDATIVO DE LAS PROTEÍNAS EN LAS NEUROESFERAS

Con el fin de determinar la oxidación proteica en muestras de neuroesferas, estas se disgregaron y se recogieron en un buffer con RIPA (dodecilsulfato sódico (SDS) 1 %, EDTA 10 mM, Tritón Tx-100 1 % v/v, NaCl 150 mM, NaPO₄ 10 mM a pH 7) suplementado con 2 % de SDS. A este extracto proteico se le añadió 10 mM de DNPH (2,4-dinitrofenilhidracina) y se calentó durante 10 minutos a 25 °C. Posteriormente, se le incorporó a la muestra 1M Tris/ 30 % de glicerol/ 15 % de β-Mercaptoetanol (β-ME). Finalmente se realizó un análisis de transferencia tipo western blot (WB) convencional con el fin de detectar 2,4-dinitrofenol (DNP) () (**Esquema 14**) (Tamarit et al., 1998; Cabiscol et al., 2000).



Esquema 14. Esquema resumen de recogida de muestras para determinar el estado de oxidación de las proteínas.

7. TRANSFERENCIA TIPO WESTERN BLOT

5.1 Extracción de proteínas

Para la obtención de extractos celulares de proteínas totales, tanto en cultivos primarios de neuronas corticales como en los cultivos de neuroesferas, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron con tampón de RIPA (dodecilsulfato sódico (SDS) 1 %, EDTA 10 mM, Tritón Tx-100 1 % v/v, NaCl 150 mM, NaPO₄ 10 mM a pH 7,0), suplementado con inhibidores de fosfatasas y proteasas. Los extractos se recogieron en hielo e inmediatamente, se hirvieron durante 5 minutos, se centrifugaron a 13000 X g, durante 10 minutos y se congelaron a -80 °C. En el caso de las neuroesferas antes de recogerlas con tampón de lisis se disgregaron con acutasa.

5.2 Determinación de la concentración de las proteínas

La cuantificación de la concentración de proteínas de las muestras se realizó mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA; Pierce™, ThermoScientific, Illinois, EE. UU). Este método colorimétrico está basado en la reducción del Cu⁺² (azul) a Cu⁺¹, en presencia de proteínas y medio alcalino (reacción de Biuret). La cantidad de Cu⁺² reducido es proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución. Así, el catión Cu⁺¹ generado reacciona con el BCA, generándose un complejo de color púrpura que absorbe luz a una longitud de onda de 562 nm y que es proporcional a la concentración de proteínas de la muestra. La absorbancia se midió espectrofotométricamente en un Multiskan Ascent (Thermo Electron Corp Basingstoke, Reino Unido) y se calcularon las concentraciones utilizando la

albúmina sérica bovina (BSA) como estándar para el cálculo de la recta patrón. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada uno de los experimentos.

5.3 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Con objeto de analizar la expresión de las proteínas de interés estas se sometieron a una electroforesis en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) (condiciones desnaturalizantes). Para ello, en función del peso molecular de las proteínas objeto de estudio, se utilizaron geles de distintos porcentajes de la mezcla de acrilamida bis-acrilamida. Los geles utilizados están constituidos por: Un gel concentrador o *stacking*, en la parte superior, de porcentaje de acrilamida (acrilamida: bis-acrilamida 29:1 (Bio-Rad Laboratories, California, EEUU) al 3 % en Tris-HCl 1 M pH 6,8 con SDS 10 %; persulfato amónico (PSA) 10 % y TEMED (N, N, N, N'-tetrametilendiamina) 0,1 %. Un gel separador o running, en la parte inferior, de distintos porcentajes de acrilamida: 6, 8, 10, 12 % en Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 con SDS 0,1 %, PSA 0,08 % y TEMED 0,08 %, en función de las proteínas de interés.

La muestra proteica (30 µg) se resuspendió en tampón de carga (β - mercaptoetanol 4 % v/v, SDS 8 % p/v, azul de bromofenol 0,02 % p/v, glicerol 4 % v/v y Tris-base 250 mM), se hirvió 5 minutos a 100 °C y se centrifugó a 13.000 X g durante 5 minutos. Para la identificación de los pesos moleculares se utilizó un marcador de peso molecular (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Posteriormente, las proteínas se separaron utilizando un sistema de electroforesis vertical (MiniProtean-3®, BioRad Laboratories, California, EE. UU.) y tampón de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 200 mM y SDS al 0,1 % p/v, pH 8,3). Una vez concluida la electroforesis, los geles se sometieron a electrotransferencia.

5.4 Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas por Western Blot

Las proteínas separadas en geles SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Hybond®, Amersham Biosciences, Nueva Jersey, EE. UU) utilizando el sistema Mini-Transblot (Bio-Rad) y tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 % v/v, pH 8,3). Con objeto de comprobar la correcta transferencia de proteínas, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con una solución de rojo Ponceau 10 % (v/v) (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos. Seguidamente, se eliminó la tinción realizando lavados con TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 al 0,1 % v/v; pH 7,5).

Para evitar la formación de las uniones inespecíficas de los anticuerpos, las membranas se bloquearon durante 1 hora con leche desnatada (Sveltesse, Nestle) al 5 % p/v en tampón TRIS con Tween (TTBS; 20 mM Tri, 500 mM NaCl, 0.1 % v/v Tween 20, pH 7.5) a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron a 4 °C y durante toda la noche, en una solución de albúmina o leche al 2% p/v en TTBS que contenía el anticuerpo primario correspondiente frente a la proteína de estudio y que se recoge en la **Tabla 2**:

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados durante la inmunodetección. En esta tabla se muestran los anticuerpos primarios utilizados para los estudios de expresión proteica por transferencia tipo Western Blot.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ESPECIE	DILUCIÓN	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
MAP2	Ratón	1/500	ab11268	Abcam
TAU	Ratón	1/500	ab80579	Abcam
PCNA	Conejo	1/500	9271	Cell Signaling
CDH1	Ratón	1/1000	MS-1116-P1	Thermo
CycB1	Conejo	1/500	9272	Cell Signaling
P21	Ratón	1/500	556431	BD
P53	Ratón	1/500	2524	Cell Signaling
HSP60	Conejo	1/1000	Ab46798	Abcam
γ H2AX	Ratón	1/500	05-6360	Millipore
GAPDH	Ratón	1/10000	4300	Ambion
ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
Ratón	Cabra	1/10000	170-6516	Biorad
Conejo	Cabra	1/10000	Sc-2030	Santa Cruz

Como control de carga se utilizó la proteína endógena gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Al siguiente día las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante una hora a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con TTBS se realizó un último lavado con el mismo tampón, pero sin Tween (TBS)

para evitar que éste interfiera con algunos de los reactivos de revelado utilizados. Por último, se incubaron las membranas, según la proteína a detectar, con los reactivos de quimioluminiscencia Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoScientific), Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EEUU. Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Finalmente, las membranas se expusieron a una película auto-radiográfica (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm) para detectar la señal. Se realizaron triplicados biológicamente independientes de cada experimento. Las cuantificaciones se llevaron a cabo con el software ImageJ64, normalizando cada valor de cada banda en cada una de las condiciones, con el valor correspondiente a la banda obtenida con su control de carga. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de cantidad de proteína respecto a la condición control de cada experimento.

5.5 Reutilización de las membranas de nitrocelulosa mediante *Stripping*

En ocasiones, las membranas de nitrocelulosa de los Western Blot se reutilizaron y se incubaron de nuevo con un anticuerpo primario distinto a la inicial. Para ello, fue necesario realizar la eliminación de las uniones antígeno-anticuerpo, tras lavar 4.5 veces las membranas con TTBS, se incubaron en una solución de *stripping* durante 7 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron 3 veces con TTBS a temperatura ambiente y se bloqueó la membrana con leche al 5 % durante 20-30 min. A partir de este momento, se realizó la incubación de los anticuerpos primarios y secundarios; el revelado se realizó de la misma manera que lo descrito en la sección anterior 5.4.

5.6 Tinción de geles con SDS-PAGE con azul de coomassie

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con solución de azul de Coomassie al 0.1 % (p/v), metanol al 50 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v) en agitación, a temperatura ambiente. A continuación, se destiñeron en una solución que contenía metanol al 20 % (v/v) en agitación, cambiando periódicamente dicha solución. Esta técnica se realizó para comprobar el porcentaje de proteínas que no se habían transferido a la membrana de nitrocelulosa.

8. INMUNOCITOQUÍMICA

Para los ensayos de inmunocitoquímica, las neuronas se sembraron sobre cubreobjetos de cristal esterilizados al fuego y tratados con una solución de poli-L ornitina 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich) y fibronectina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich) o sobre placas de Ibidi, previamente tratadas con poli-D-lisina. A los diferentes días del cultivo, las neuronas se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % (p/v) toda la noche a 4 °C. Al siguiente día los cristales se incubaron con glicina 0,1 M en PBS durante 20 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,25 % (v/v) en PBS durante 5 minutos. Posteriormente, se incubaron en una solución de bloqueo (Tritón X-100 al 0,1 % v/v y suero de cabra al 10 % v/v en PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora. Los anticuerpos primarios utilizados se indican en la **Tabla 3** y se prepararon en una solución de incubación compuesta por suero de cabra al 5 % en PBS, y se pusieron en contacto con las muestras durante la noche a 4 °C en agitación suave. Al día siguiente los cristales se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con los fluoróforos Cy2 o Cy3 a una dilución 1/500 (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, EE. UU.) en suero de cabra al 5 % en tampón PBS. Se mantuvieron

durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación suave. Tras ello, se lavaron con PBS para retirar el anticuerpo sobrante, y se incubaron durante 10 minutos con el marcador nuclear DAPI 30 μ M (Sigma-Aldrich). Los cubreobjetos se lavaron con PBS, tras los cuales se montaron sobre portaobjetos utilizando el Slow Fade Antifade y de esta manera evitar la pérdida de fluorescencia.

La visualización y adquisición de microfotografías confocales se llevó a cabo utilizando un microscopio Leica TSC-SL (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania) y un spinning disk Roper Scientific con microscopio Olympus IX81 (Olympus®, Tokyo, Japón). Se tomaron entre 10-15 microfotografías de cada genotipado por condición o tratamiento experimental, procedente de al menos 3-4 cultivos independientes. El análisis de imágenes se realizó mediante el software Image Jx64.

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios. En esta tabla se muestran los anticuerpos primarios utilizados en los estudios de expresión proteica mediante análisis de inmunocitoquímica.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ESPECIE	DILUCIÓN	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
MAP2	Ratón	1/500	ab11268	Abcam
Nestin	Rata	1/500	556309	BD
TUJ1	Conejo	1/500	ab18207	Abcam
BrdU	Rabbit	1/500	ab	Abcam
TAU	Ratón	1/500	ab8152	Abcam
ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
Cy2	Ratón	1/250	115.225.003	Jackson
Cy2	Conejo	1/250	111.225.003	Jackson
Cy3	Ratón	1/250	111.165.003	Jackson
Cy3	Conejo	1/250	111.175.003	Jackson
SONDA NUCLEAR				
DAPI		30uM	D#9542	Sigma

9. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN MEDIANTE TINCIÓN CON BrdU EN NEUROESFERAS PRIMARIAS

En nuestras condiciones experimentales, estudiamos el proceso proliferativo en las neuroesferas primarias. Para ello utilizamos dos tipos de análisis diferentes, uno consistente en inmunocitoquímica.

El estudio de la proliferación en las neuroesferas embrionarias, se realizó de la siguiente manera: las neuroesferas primarias a los 6 DIV se sembraron en placas de 24 pocillos tratadas previamente con poli-L-ornitina y fibronectina. A los 15 minutos tras su siembra, se realizó un pulso de 30 minutos con BrdU 10 μ M. Posteriormente, las células se fijaron con PFA al 4 % toda la noche. Tras la fijación de las células se incubaron con HCl 2N durante 20 minutos a 37 °C con objeto de desnaturalizar el ADN y seguidamente se neutralizó la acción del HCl incubando las células durante 15 minutos con la solución de borato 0,1 M a pH 8,5 y a temperatura ambiente (Ferrón et al., 2007). A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-BrdU (Tabla 3-lista de anticuerpos) durante 24 h a 4 °C. Al día siguiente se siguió el mismo protocolo previamente descrito en el apartado 8 de Inmunocitoquímica.

10. ANÁLISIS DE CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO Y TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO

Existe una gran variedad de fluorocromos para realizar el análisis del ADN y en todos los casos, resulta necesario que la molécula fluorescente se una a la molécula de ADN estequiométricamente, con objeto de relacionar directamente la cantidad

de fluorescencia medida con el contenido celular de ADN existente. El fluorocromo más utilizado para este tipo de estudios es el Yoduro de Propidio (IP). Se excita con luz entorno a los 480 nm (para lo cual resulta válido un láser de Argon-ion) y emite fluorescencia roja (entorno a los 620 nm). Las moléculas de IP se intercalan entre los pares de bases de los ácidos nucleicos, tanto del ADN como del ARN, por lo cual es necesario eliminar éste último por procesos enzimáticos si se quiere una determinación lo más exacta posible de la cantidad de ADN.

Las células se disgregaron con Accutase® y se fijaron con etanol al 70 % frío durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron con Tx-PBS conteniendo este tampón un detergente Tween (Tween+PBS), con la finalidad de permeabilizar las células. Las células se incubaron con la solución de IP, suplementada con ARNsa durante 20 minutos a 37 °C. Finalmente, las muestras se analizaron en el canal FL3 mediante citómetro de flujo.

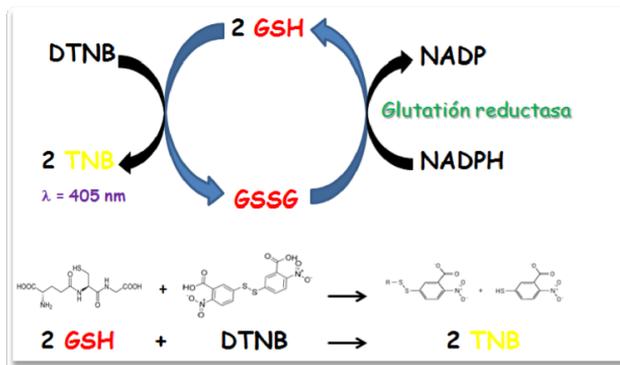
11. ANÁLISIS DE LA CANTIDAD DE GLUTATIÓN EN NEUROESFERAS PRIMARIAS

Para determinar la concentración de glutatión, las neuroesferas se disgregaron y se centrifugaron. El pellet se resuspendió rápidamente con ácido 5-sulfosalicílico al 1 % p/v. Este lisado celular se centrifugó a 13 000 X g durante 5 minutos y la concentración de glutatión total, que es la suma del glutatión reducido más dos veces el oxidado ($GS_x = GSH + 2GSSG$), se midió en el sobrenadante usando un protocolo descrito previamente (Tietze, 1969) tal y como se resume en el **Esquema 14**. Al precipitado celular se le añadió un volumen igual de NaOH 0,1 M para la cuantificación de proteínas. El ensayo se basa en la oxidación de GSH (glutatión reducido) a expensas de la reducción de DTNB (5,5'-ditiobis-(ácido 2-

nitrobenzoico) (Sigma-Aldrich) a TNB ($\lambda_{\text{max}}=405 \text{ nm}$). El GSSG recién formado (glutati3n oxidado) se regenera a GSH a trav3s de la actividad enzim3tica de la glutati3n reductasa (GR), que necesita NADPH (H^+) como cofactor. Esta es una reacci3n c3clica cuya velocidad de reacci3n es directamente proporcional a la GSx (concentraci3n total de glutati3n).

Esta determinaci3n se realiz3 en una placa de 96 pocillos mezclando 10 μl de muestra, 90 μl de agua y 100 μl de tamp3n de reacci3n (EDTA 1 mM, DTNB 0,3 mM, DTNB 0,4 NADPH mM, glutati3n reductasa 1 U/ml, preparado en PB 0,1 mM, pH 7,5). Para cuantificar los niveles de glutati3n oxidado, las muestras se trataron con 2-vinilpiridina. Los aumentos de absorbancia, tras la reacci3n entre GSH y DTNB, se midieron utilizando un Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher) a 405 nm, cada 15 segundos durante 2,5 minutos (10 medidas en total).

Paralelamente, se llev3 a cabo una recta patr3n a partir de soluciones est3ndar de GSSG de concentraciones de 0 a 50 μM . La concentraci3n de GSx (nmol / mg prote3na) se calcul3 a partir de las pendientes obtenidas en las muestras, extrapol3ndolas a las obtenidas en la recta patr3n.



Esquema 14. Determinación enzimática de la concentración de glutatión. La reducción del DTNB paralela a la oxidación del glutatión permite determinar su concentración a 405 nm. Todo el glutatión oxidado (GSSG) es de nuevo reducido a GSH por la Glutatión reductasa, usando el NADPH como cofactor.

12. EXTRACCIÓN DE ARN DE LAS NEUROESFERAS PRIMARIAS Y CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS

La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el kit comercial Genelute™ Mammalian Total RNA Kit (Sigma-Aldrich).

Las neuroesferas y las neuronas en cultivo se lisaron con una mezcla de β -mercaptoetanol: Tampón de solución de lisis en proporción 1:100 (v/v). Los lisados se filtraron en columnas Genelute para eliminar los restos celulares y desechar el ADN, y se centrifugaron a 16.000 X g. Posteriormente, se añadió un volumen equivalente de etanol al 70 % en agua DEPC (Di-etil-piro-carbonato) libre de RNasas y las muestras se agitaron hasta mezclarse completamente. A continuación, dicha mezcla se pasó de nuevo por la columna de unión (Genelute Binding), donde se quedó adherido el ARN. Tras eliminar el filtrado, la columna se lavó una vez con una solución denominada solución de lavado (Wash Solution 1). Una vez separado el ARN, se trató la columna con 100 U de DNasa I (DNase I, RNase-free, Roche), durante 15 minutos, a temperatura ambiente en un tampón compuesto por Tris-HCl 400 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 60 mM y CaCl₂ 10 mM; pH 7,9. Tras la incubación, para eliminar todos los restos de DNA y evitar la amplificación de ADN genómico, se lavaron las columnas tres veces, una con soluciones de lavado (Wash Solution 1) y otra vez con una solución de lavado (Wash Solution 2) Concentrado/etanol, que permite un secado completo de la columna. Finalmente, el contenido de la columna se eluyó en un tubo limpio con 50 μ l de solución de elución mediante centrifugado a 16.000 X g durante 1 minuto.

Así, con el ARN purificado obtenido en el filtrado se midió su concentración con un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 (Thermo Fischer Scientific). La ratio de absorbancia de 260 frente a 280 nm que determina la pureza del RNA, que se obtuvo fue de 1.8-2.

13. ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD NEURONAL MEDIANTE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR

Mediante esta técnica analizamos la expresión diferencial de genes que cuantificamos de forma relativa respecto a un control interno de expresión endógena (*housekeeping*; *Gapdh*).

La PCR a tiempo real (RT-PCR) gracias a la emisión de fluorescencia por parte de un fluorocromo (SYBR Green), que se intercala entre las hebras de ADN bicatenario, permite obtener la cantidad de producto de PCR amplificado o amplicón que será proporcional a la fluorescencia obtenida en cada caso. Antes de analizar la expresión de los diferentes genes, se puso a punto la concentración de cada oligonucleótido empleado como cebador (primer) y se calcularon las eficiencias de amplificación de los primers diseñados con los softwares Geneious (Versión pro-Trial, Biomatters Limited, Auckland, Nueva Zelanda) y Ampliflix (Universidad de Marsella, Marsella, Francia). Se consideraron óptimas las eficiencias comprendidas entre el 85 y el 115 % (*Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real- Time Quantitative PCR*, AppliedBiosystems). La obtención de las eficiencias de cada primer es necesaria para poder comparar la expresión de los diferentes genes mediante el Método Comparativo de Ct ($\Delta\Delta Ct$). Las condiciones en las que se emplearon los distintos oligonucleótidos se resumen en la siguiente **Tabla 4**.

Tabla 4. Secuencias y condiciones experimentales de los cebadores utilizados en la RT-PCR.

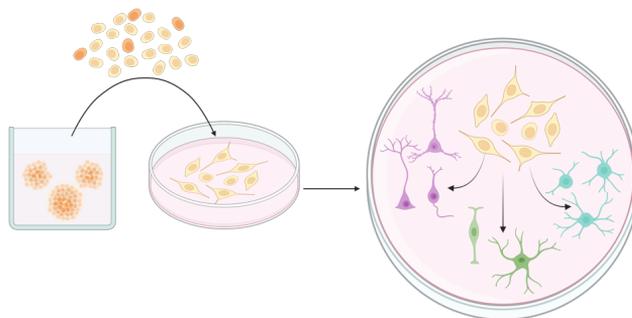
DIANA		SECUENCIA	[μ M]	EFICIENCIA
<i>Gfap</i>	F	AAGATGAAACCAACCTGAGGC	0,3	98
	R	CGAACTCCTCCTCATAGATC		
<i>Ascl1</i>	F	CTTGAACTCTATGGCGGGTTC	0,3	101,31
	R	GCCATCCTGCTTCCAAAGTC		
<i>Tubb3</i>	F	ATAGACCCAGCGGCAACTA	0,3	106,49
	R	CCGAACACTGTCCATGGTTC		
<i>Arc</i>	F	CACTCTCCCGTGAAGCCATT	0,3	99
	R	TCCTCCTCAGCGTCCACATA		
<i>c-FOS</i>	F	GGGAATGGTGAAGACCGTGT	0,3	94,5
	R	GCATGGACTGTGGTCATGA		
<i>Nox1</i>	F	AAATTCCAGCGTGCCGACAA	0,1	94,3
	R	AACCAGGCAAAGGCACCTGT		
<i>Nox2</i>	F	ATGCAGGAAAGGAACAATGC	0,1	95,3
	R	GTGCACAGCAAAGTGATTGG		
<i>Nox4</i>	F	TGCAGAGATATCCAGTCCTTCC	0,1	98
	R	TCCCATCTGTTTACTGAGG		
<i>Hom-1</i>	F	AGCACAGGGTGACAGAAGAG	0,4	102
	R	GAGGGACTCTGGTCTTTGTG		
<i>Nrf2</i>	F	GCAGGACATGGATTTGATTGA	0,4	94,91
	R	GTCAAACACTTCTCGACTTAC		
<i>Glc3</i>	F	GGCACAAGGACGTGCTCAAGT	0,3	86
	R	TGCAGAGTTTCAAGAACATCG		
<i>Nqo1</i>	F	GGGGACATGAACGTCATTCTCT	0,4	97,5
	R	AAGACCTGGAAGCCACAGAAGC		
<i>Gapdh</i>	F	TCAGCAATGCCTCCTGCACCA	0,3	108,2
	R	GCATGGACTGTGGTCATGAG		

En la cuantificación de la expresión de los genes de estudio, se utilizó el kit comercial Power SYBR. Green RNA-to-Ct™ 1-Step Kit (Applied Biosystems, California, EE.UU), que permite acoplar la retrotranscripción y la amplificación en un único paso. Se partió de 100 ng de RNA y el volumen final por reacción fue de 20 μ l. Todas las reacciones se realizaron por triplicado utilizando el termociclador Mastercycler.ep Realplex (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El perfil de cada reacción fue el siguiente: un ciclo de 30 minutos a 48 °C (etapa de retrotranscripción), un ciclo de 10 minutos a 60 °C (activación de la enzima DNA polimerasa), 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C (desnaturalización) y 1 minuto a 60 °C (anillamiento y elongación).

El valor que se obtuvo para cada reacción fue el ciclo umbral (Ct; *threshold cycle*) o ciclo en el que la fluorescencia emitida por el SYBR Green es detectable dentro de la fase lineal. Se obtiene el Ct para cada uno de los genes de estudio y para el housekeeping (Gapdh). El incremento de Ct (Δ Ct) es la diferencia entre el Ct de cada gen y el Ct de la GAPDH. El Método Comparativo de Ct relaciona el número de copias entre las distintas condiciones, que se obtiene al final de una reacción optimizada empleando la fórmula (Bustin et al. 2009): $Ct [2^{-\Delta\Delta Ct}]$. Consideramos como calibrador la condición sobre la que se compara la expresión y sobre la que se relativiza los resultados dándole el valor de 1. Niveles de expresión igual a 1 indican que la muestra problema presenta la misma expresión de un determinado gen que el control. Niveles >1 indican que hay un incremento de expresión con respecto al control, y niveles <1 indican que la expresión disminuye con respecto al control. Los resultados se mostraron en unidades arbitrarias de expresión, *cantidad relativa* de ARNm entre la muestra problema y el control.

14. ANÁLISIS DE LA DIFERENCIACIÓN DE LOS LINAJES CELULARES OBTENIDOS A PARTIR DE LAS NEUROESFERAS PRIMARIAS

Con objeto de estudiar la capacidad que tenían, las neuroesferas mCAT y wt , de diferenciar en los tres linajes principales: astrocitos, neuronas y oligodendrocitos, las células se sembraron a una densidad de 100.000 cel/cm² sobre un sustrato adhesivo (Geltrex, Growth Factor Reduced Matrigel Matrix, Thermo Fisher) en medio DMEM/F12 (previamente descrito en la Sección 2 de material y métodos) con bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) 10 ng/ml durante 2 días, lo que permitió la producción masiva y supervivencia de células progenitor neuronales y oligodendrogliales (**Esquema 15**). Pasados estos dos días se retiraron los factores de crecimiento del medio y se añadió un 2 % de SF (Belenguer et al., 2017). Las células se recogieron a diferentes días según los estudios a realizar.



Esquema 15. Representación esquemática del protocolo de diferenciación de neuroesferas. Las neuroesferas se disgregaron y se sembraron sobre un sustrato adherente. Posteriormente se recogieron a diferentes días en cultivo.

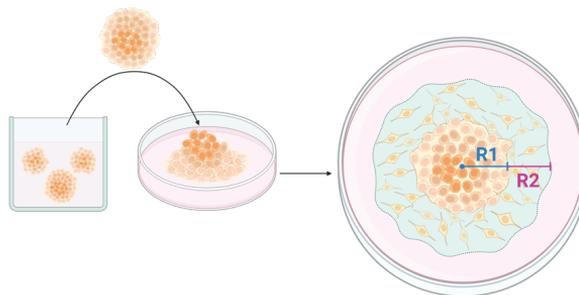
15. MEDIDA DE LA LONGITUD TELOMÉRICA

La extracción de ADN se llevó a cabo con el kit comercial Qiagen kit (QIAmp® ADN blood kit) siguiendo las instrucciones del fabricante. A los 6 días de cultivo, las neuroesferas se disgregaron con acutasa, se centrifugaron y ese pellet se utilizó para extraer el ADN. Se midió la concentración de ADN purificado con un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 (Thermo Fisher). La pureza del ADN se determinó mediante el ratio de absorbancias A260/280, siendo óptima entre 1,8 y 2.0.

La longitud telomérica se midió mediante qPCR empleando el kit comercial Absolute Mouse Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (ScienCell, Catalog #M8918). Este kit contiene oligonucleótidos que reconocen y amplifican las secuencias teloméricas (TEL) y oligonucleótidos que reconocen y amplifican una región de 100 bp en el cromosoma 10 que sirve como referencia para la normalización de los resultados (SCR; *Single Copy Reference*). Se incluye también un fragmento de ADN genómico de referencia, con una longitud telomérica conocida, como control para calcular la longitud telomérica de las muestras problema. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler®ep Realplex (Eppendorf), empleando Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Los fragmentos TEL y SCR se amplificaron usando 1 uL de cada oligonucleótido específico, 10 uL de SYBR Green PCR MasterMix (Applied Biosystems), y 7 uL de agua. La cantidad total de ADN en cada reacción fue de 5 ng. El programa de amplificación fue el siguiente: 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg, 60 °C durante 1 min. Para calcular la expresión relativa de cada amplicón y cuantificar los resultados se empleó el método comparativo de Ct [$2^{-\Delta\Delta Ct}$].

16. ENSAYO DE MIGRACIÓN DE NEUROESFERAS

Para el ensayo de migración las neuroesferas a los 6 días en cultivo se sembraron en placas de 24 pocillos pretratadas con poli-L-ornitina y fibronectina. Se tomaron imágenes mediante microscopía de contraste fases cada 6 h durante 1 día, lo que permitió el seguimiento de la migración de las NPCs (células progenitoras neurales) fuera de las neuroesferas. Para la cuantificación de la migración se tuvo en cuenta el radio inicial de las neuroesferas (Kong et al., 2008.), con objeto de minimizar las diferencias en la distancia de migración, que pudiesen ser debidas al tamaño de partida de la neuroesfera (**Esquema 16**).



Esquema 16. Esquema de ensayo de migración. En el esquema se muestra tanto el protocolo utilizado por la realización de éste, como la cuantificación de los resultados. Para la cuantificación se realizó el ratio entre la distancia de migración (R2) y el radio inicial de la neuroesfera (R1).

17. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO

- Tejido embrionario:

Los embriones (wt y mCAT) a distintas etapas del desarrollo (E12, E15, E18) se obtuvieron de gestantes de acuerdo con los estándares de cuidado animal de la

Universidad de Salamanca y siguiendo la normativa vigente e indicada previamente para el manejo de animales de experimentación. Tras lavarse en tampón PBS frío, las cabezas de los embriones E12 y E15 se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % (p/v) y con 10 % (v/v) de metanol en tampón fosfato 0,2 M pH 7,4 durante 10 días a 4 °C. Los encéfalos completos (bulbos olfatorios, hemisferios corticales, cerebelo y bulbo raquídeo) se extrajeron del cráneo y se fijaron posteriormente durante dos días más con solución de paraformaldehído (PFA) 4 %. Seguidamente, se enjuagaron sucesivamente durante 10 min, 30 min y 2 h, 4 h, 8 h, 12 h con 0,1 M PB (pH 7,4), y se sumergieron en sacarosa/PBS a porcentajes de 10, 20 y 30 % (p/v) secuencialmente hasta que se hundieron. Los tejidos se incluyeron en un compuesto de temperatura de corte óptimo denominado OCT (n.º de catálogo 4583; Thermo Fisher Scientific) y se congelaron en nitrógeno líquido. Finalmente, los cerebros se cortaron en el plano sagital en un criostato (Leica CM 1950 AgProtect,) a 20 µm y se montaron en portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific).

- Tejido postnatal:

Los ratones postnatales (wt y mCAT) p0, p7, p14 y p21, así como los E18 se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de mezcla (1:4) de clorhidrato de xilacina (Rompun; Bayer) y ketamina (Imalgene; Merial), usando 1 ml de la mezcla por kg de peso. A continuación, se perfundieron vía aorta con una solución de NaCl al 0,9 %, seguido de 5 ml por gramo de peso del fijado (4 % (p/v) paraformaldehído, 0,4 (p/v) con metanol en buffer fosfato 0,1 M; pH 7,4. Una vez perfundidos, los cerebros se extrajeron cuidadosamente y se fijaron en solución de PFA con metanol al 10 % durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente los bloques de cerebro se lavaron sucesivamente durante 10 min, 30 min, 2, 6, 12 y 24 horas

con una solución de tampón fosfato (PB 0,1 M; pH 7,4), y se sumergieron secuencialmente en una solución de sacarosa en PBS al 10 %, 20 % y 30 % (p/v). Tras la crioprotección del tejido se obtuvieron secciones sagitales de 20 μ m de espesor mediante un criostato (Leica CM 1950 AgProtect, Leica).

18. INMUNOFLUORESCENCIA *IN VIVO*

Las secciones sagitales se lavaron tres veces PB 0,1 M durante 5 minutos. Los cortes se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios en tampón PB 0,1M que contenía Tritón X-100 al 0,2 % y suero de cabra al 5 %, durante 48-72h a 4°C. Al día siguiente se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con el fluoróforo (Cy3 o Cy2 de Jackson) durante 2 y a temperatura ambiente. Ver en la **Tabla 5** la lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados. Posteriormente, los núcleos se tiñeron con 4,6-diamino-2-fenillindol 0,5 μ g/ml (DAPI, Sigma D95429) durante 7 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, las secciones se trataron montaron con el medio de montaje Fluoromont (F4680, Sigma). Las preparaciones se examinaron mediante microscopia de epifluorescencia empleando conjuntos de filtros apropiados de un microscopio invertido (Nikon Invertido microscope Eclipse Ti-E, Japan. Las cuantificaciones se realizaron por triplicado en tres regiones diferentes de la corteza cerebral.

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para los estudios de inmunohistoquímica.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ESPECIE	DILUCIÓN	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
MAP2	Ratón	1/500	ab11268	Abcam
Nestin	Rata	1/500	556309	BD
TUJ1	Conejo	1/500	ab18207	Abcam
BrdU	Conejo	1/250	ab8152	Abcam
TBR2	Conejo	1/500	ab216870	Abcam
SATB2	Ratón	1/50	ab92446	Abcam
CTIP2	Rata	1/1000	Ab18465	Abcam
ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
Cy2	Ratón	1/250	115.225.003	Jackson
Cy2	Conejo	1/250	111.225.003	Jackson
Cy3	Ratón	1/250	111.165.003	Jackson
Cy2	Rata	1/250		Jackson
Cy3	Conejo	1/250	111.175.003	Jackson
SONDA NUCLEAR				
DAPI		30 um1/7000	D#9542	Sigma

16.1 Análisis de proliferación in vivo

Con el fin de evaluar la proliferación celular in vivo, a las ratonas gestantes se les inyectó con un análogo estructural de la timidina, la *5-bromo-2-desoxiuridina* (BrdU) (BD) 50 mg/kg y a las 2 horas tras la inyección, se sacrificaron obteniendo los embriones de acuerdo con los estándares de cuidado animal de la Universidad de Salamanca y siguiendo la normativa vigente e indicada previamente para el manejo de animales de experimentación (Sección 1 de Material y Métodos). Los cerebros de estos embriones se procesaron, tal y como se ha descrito en el apartado anterior (Apartado 17).

Para determinar la cantidad de células que se encontraban en la fase proliferativa, se realizó el siguiente protocolo de inmunofluorescencia: los cortes de cerebro obtenidos (wt y mCAT) se trataron durante 30 minutos con HCl 2 N a 37 °C con el fin de desnaturalizar el ADN y permitir la entrada del anticuerpo. Posteriormente los cortes se incubaron con el anticuerpo primario 72 h a 4 °C, una vez pasado este tiempo se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con el fluoróforo (Cy3 o Cy2 de Jackson) (**Tabla 5**) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los núcleos se tiñeron con 4,6-diamino-2-fenillindol 0,5 ug/mL (DAPI, Sigma D95429) durante 7 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, las secciones se trataron con el medio de montaje Fluoromont (F4680, Sigma). Las inmnohistoquímicas se visualizaron en un microscopio invertido (Nikon Invertido microscope Eclipse Ti-E, Japan), realizándose un triplicado de muestras y condición para su posterior cuantificación.

16.2 Tinción mediante Nissl

Esta tinción se utilizó con objeto de estudiar la estructura, la distribución, el tamaño y la morfología de los somas neuronales, de las diferentes áreas del cerebro y objeto de estudio. Para ello, se utilizó un colorante sintético básico: el violeta de cresilo. El violeta de cresilo se usa especialmente para la tinción nuclear y visualización de los cuerpos de Nissl. Los cortes de tejido se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron a temperatura ambiente en una mezcla 1:1 de alcohol absoluto/cloroformo durante toda la noche. Este paso se realiza para eliminar la grasa y así conseguir menor tinción de fondo. Seguidamente se hidrataron pasándolos por una batería de etanoles a concentraciones y porcentajes decrecientes (100, 96, 90, 80, 70, 60 y 50 %) preparados en H₂O destilada (H₂Od) y se tiñeron durante 5-20 minutos en violeta de cresilo al 1 % (v/v) en H₂Od. A continuación, se enjuagaron en H₂Od y se diferenciaron en el alcohol de 96° y se deshidrataron en otra batería de etanoles en este caso a concentración creciente. Finalmente, los cortes se aclararon en xileno durante 15 min y se cubrieron utilizando la solución de Entellan (1.07960, Sigma). Las imágenes se adquirieron mediante un microscopio de campo claro.

19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las determinaciones se realizaron en al menos tres réplicas biológicas (cultivos o animales). Los valores se expresaron como medias \pm S.E.M. (error estándar de la media) de, al menos, tres experimentos independientes. La significatividad se determinó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de Bonferroni (para comparaciones múltiples) o el test de la t de Student (para comparaciones entre dos únicos grupos de valores). En todos los casos, un valor

de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con ayuda del software Graphpad Prism 8 (IBM, Nueva York, EEUU).

Resultados

I. BLOQUE 1

1. La reducción endógena de las mROS altera la diferenciación neuronal

Recientemente, se ha demostrado que, en los astrocitos, la reducción de las ROS mediante la expresión de la catalasa en la mitocondria (mCAT), altera la función cognitiva (Vicente-Gutierrez et al., 2019). Así, la reducción de las mROS astrocíticos da lugar a importantes cambios metabólicos en las neuronas, lo que provoca alteraciones en la red neuronal y, con ello, el deterioro cognitivo de los animales. En este sentido, se sabe que muchos de los procesos que alteran el equilibrio celular provocan una alteración de la función cerebral. De hecho, hemos demostrado que, durante el desarrollo embrionario, la ausencia de Cdh1, principal activador del complejo promotor de la anafase (APC; *anaphase promoter complex*) en el SNC que coordina la proliferación y diferenciación de las NPCs, provoca la desestructuración de la corteza cerebral, originando un fenotipo de microcefalia (Delgado-Esteban et al., 2013). Por lo tanto, decidimos estudiar el efecto de la reducción endógena de las mROS en el desarrollo del cerebro durante el periodo perinatal.

Una primera aproximación fue estudiar el proceso de diferenciación en un modelo de neuronas corticales de 14,5 días en cultivo primario, procedentes de camadas con individuos de ambos genotipos, wt y mCAT. Para ello, analizamos a distintos días de diferenciación los niveles proteicos de marcadores de neuronas maduras, MAP2 (marcador neuronal dendrítico) y TAU (marcador neuronal axónico) (Dehmelt and Halpain, 2005). Tras el análisis de transferencia tipo Western Blot,

los resultados obtenidos (**Figura 1**) mostraron que, aunque la expresión de MAP2 y TAU se incrementó en ambos genotipos a lo largo de los días de diferenciación (DIV), observado desde el primer día en cultivo (1 DIV), en las neuronas mCAT existe un mayor aumento de estos marcadores, respecto a las wt. Por el contrario, a días de diferenciación más largos, 12 DIV, los niveles de ambos marcadores disminuyeron en las neuronas mCAT en comparación con las wt. Este efecto indica una diferenciación acelerada en las neuronas mCAT, así como un envejecimiento o desestructuración del citoesqueleto neuronal en estadios más avanzados.

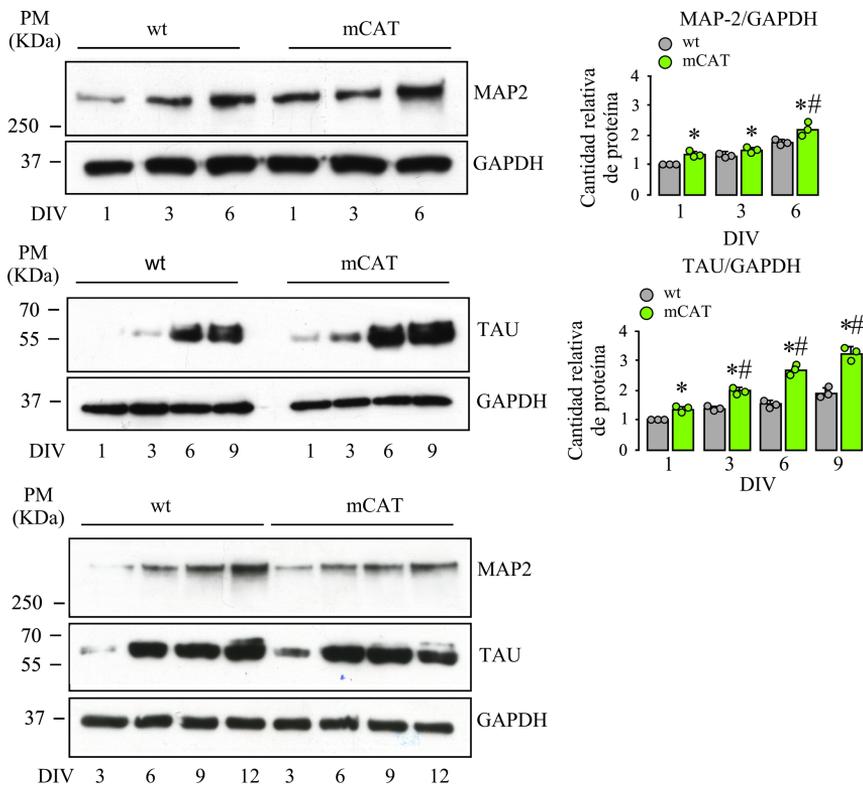


Figura 1. La reducción de las mROS modifica la expresión de marcadores de diferenciación neuronal. Niveles de expresión de TAU y MAP2, analizados mediante WB en neuronas corticales recogidas a diferentes días en cultivo primario. La expresión de GAPDH se utilizó como control de carga. Los resultados se expresaron normalizados frente a la condición wt 1 DIV (días in vitro). Los datos son medias \pm SEM; * $p < 0.05$ vs wt, # $p < 0.05$ vs mCAT 1 DIV (Anova de dos vías, $n=3$ experimentos independientes).

Paralelamente, analizamos la expresión de los marcadores: MAP2 (marcador dendrítico de neuronas maduras) y TUJ1 (marcador de estadio temprano de diferenciación) a días más cortos de diferenciación *in vitro* (2 DIV). En las microfotografías de la **Figura 2**, se muestra un mayor crecimiento dendrítico en las neuronas mCAT en comparación con las wt, hecho que confirma la acelerada diferenciación neuronal en las neuronas mCat y concuerda con los resultados previos mostrados en la **Figura 1**.

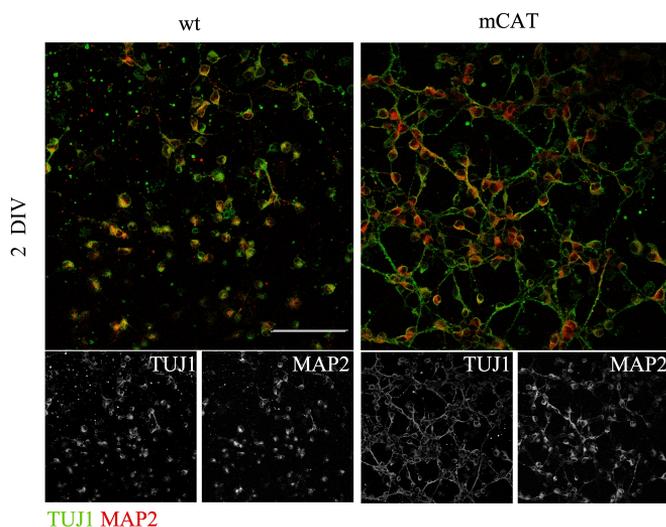


Figura 2. La reducción de las mROS modifica la expresión de marcadores dendríticos. Microfotografías de fluorescencia confocal procedentes de cultivos primarios de neuronas corticales que muestran los marcadores de diferenciación TUJ1 (verde) y MAP2 (rojo) a 2 DIV tras inmunocitoquímica. Imágenes representativas de un total de 3 cultivos independientes. Se muestra en gris cada canal de fluorescencia por separado para cada proteína Barra de escala: 100 μ m.

Seguidamente, quisimos profundizar en estos resultados realizando el seguimiento del patrón de expresión de la proteína neuronal TAU y MAP2, a 3 y 6 DIV, mediante inmunocitoquímica (**Figura 3**).

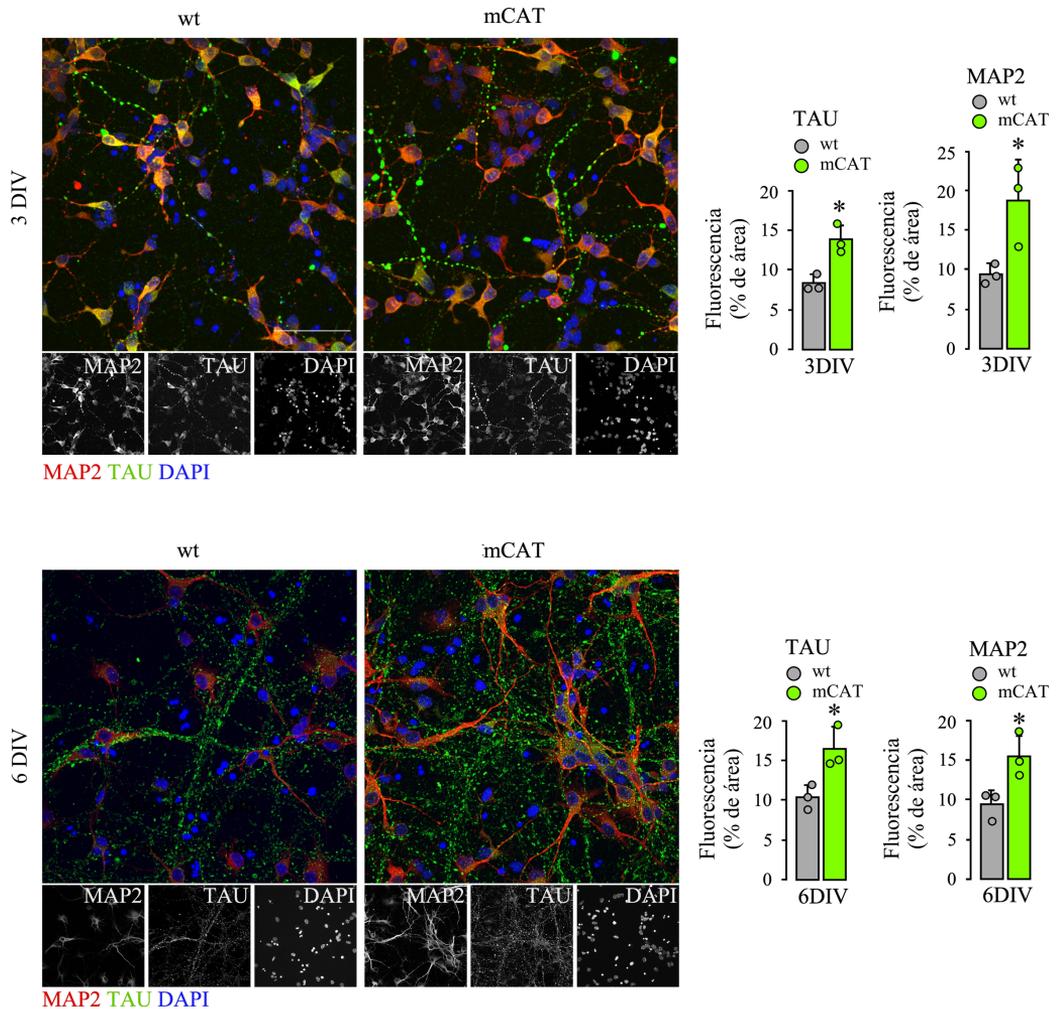


Figura 3. La reducción de las mROS altera el crecimiento axónico. Microfotografías de fluorescencia confocal procedentes de cultivos primarios de neuronas corticales que muestran los marcadores de diferenciación TAU (verde) y MAP2 (rojo) a 3 y 6 DIV, mediante inmunocitoquímica. Imágenes representativas de un total de 3 cultivos diferentes. Se muestra cada canal de fluorescencia por separado para cada proteína. Cuantificación de un total de 10 fotos por genotipo. Barra de escala: 50 μ m.

En su conjunto, estos resultados indican que las neuronas corticales mCAT en cultivo primario presentan un aumento en la expresión de los marcadores de diferenciación neurítica, respecto a las neuronas wt. Ello evidencia que la

disminución de los mROS promueve la diferenciación acelerada en los primeros días de diferenciación de las neuronas mCAT, lo que podría ser responsable de un envejecimiento prematuro en las neuronas mCAT a los 12 DIV. Estos resultados confirman los resultados observados en un trabajo de tesis Doctoral previa de nuestro laboratorio (Tesis Norah Saud Alothman, 2019).

2. La reducción de las mROS provoca cambios en la actividad neuronal

Posteriormente, y una vez demostrado el diferente perfil de diferenciación de las neuronas mCAT y wt, nos preguntamos si ello se relacionaría con cambios en la actividad neuronal. Para ello, analizamos los niveles de expresión de genes *Arc* y *c-Fos* en las muestras de neuronas corticales en cultivo primario, mediante RT-PCR (apartado 8 de Material y Métodos).

Fos es un factor de transcripción que se expresa en el núcleo de las células neuronales y está involucrado en la regulación de la expresión génica en respuesta a la actividad neuronal, indicando en gran medida actividad sináptica. Por otro lado, *Arc* es una proteína que se expresa en las dendritas y se asocia con el citoesqueleto, también en respuesta a la actividad neuronal. Por tanto, la expresión de ambos genes son indicadores de la actividad neuronal (Heroux et al., 2018). Como se muestra en la **Figura 4**, los niveles de expresión de *Arc* y de *c-Fos* en las neuronas mCAT fueron muy superiores a los obtenidos en las neuronas wt, a los 6 DIV. Esta tendencia ya se aprecia a los 3 DIV, y refleja una mayor actividad neuronal en las células mCAT respecto a las wt. Dicho efecto se correlaciona con el aumento en los marcadores de diferenciación mostrados anteriormente (**Figuras 2 y 3**). Por tanto, la acelerada diferenciación de las neuronas mCAT es funcional,

ya que se asocia la mayor diferenciación estructural con el incremento en la actividad neuronal.

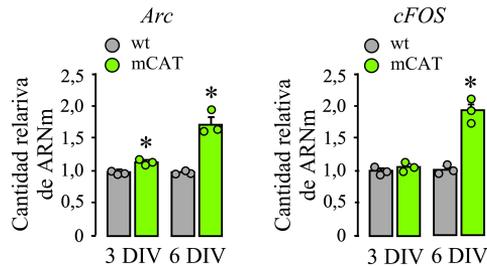


Figura 4. La reducción de las mROS endógenas provoca cambios en la actividad neuronal. Análisis de la expresión relativa de *Arc* y *cFos* mediante RT-qPCR en neuronas corticales primarias a los 3 DIV y 6 DIV. Se usó el gen *Gadph* como control de gen endógeno. Los resultados se expresaron normalizados frente a la condición wt. Los datos son medias \pm SEM; * $p < 0.05$ vs wt, (test *t*-student; $n = 3$ experimentos independientes).

3. La reducción de las mROS afecta a la distribución y morfología de las mitocondrias

Tal y como se ha descrito en la Introducción, la dinámica y el metabolismo de las mitocondrias va cambiando durante la diferenciación de las neuronas corticales (Itawa et al., 2023). Debido a que, en el modelo utilizado la expresión de la catalasa se realizó específicamente en la mitocondria, decidimos estudiar diferentes parámetros mitocondriales, con objeto de detectar posibles alteraciones en estos orgánulos. En primer lugar, analizamos los niveles la proteína HSP60, una chaperona de la matriz mitocondrial, mediante WB, a los 3 DIV. La **Figura 5** se muestra que no hubo diferencias en la cantidad de mitocondrias entre ambos genotipos, a juzgar por los niveles similares de HSP60.

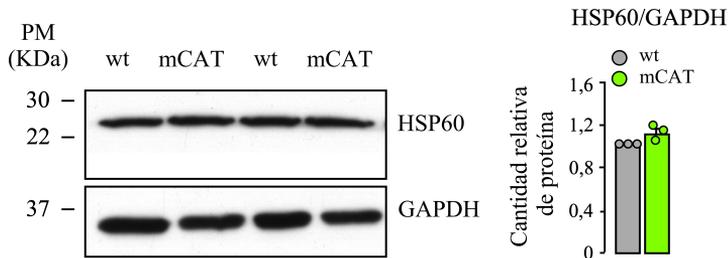


Figura 5. La expresión de la catalasa en la mitocondria no modifica la cantidad de mitocondrias. Niveles de expresión de HSP60 analizados mediante Western Blot de neuronas corticales en cultivo primario recogidas a 3 DIV. La expresión de GAPDH se utilizó como control de carga. Los resultados se expresaron normalizados frente a la condición wt. Los datos son medias \pm SEM, (test t-student, $n=3$ experimentos independientes).

En segundo lugar, analizamos la proteína TOMM20, marcador de la membrana externa mitocondrial, mediante inmunocitoquímica, lo que nos permitió analizar la localización y la morfología mitocondrial en neuronas wt y mCAT. Tal y como se observa en la **Figura 6**, existe una distribución y una morfología diferente entre ambos genotipos. Así, mientras que las mitocondrias de las neuronas wt se localizan, mayoritariamente, en la zona perinuclear y el cono axónico, en las neuronas mCAT las mitocondrias se distribuyen por toda la neurona, incluso en las dendritas. Es más, las neuronas mCAT presentan una morfología menos fragmentada que las wt.

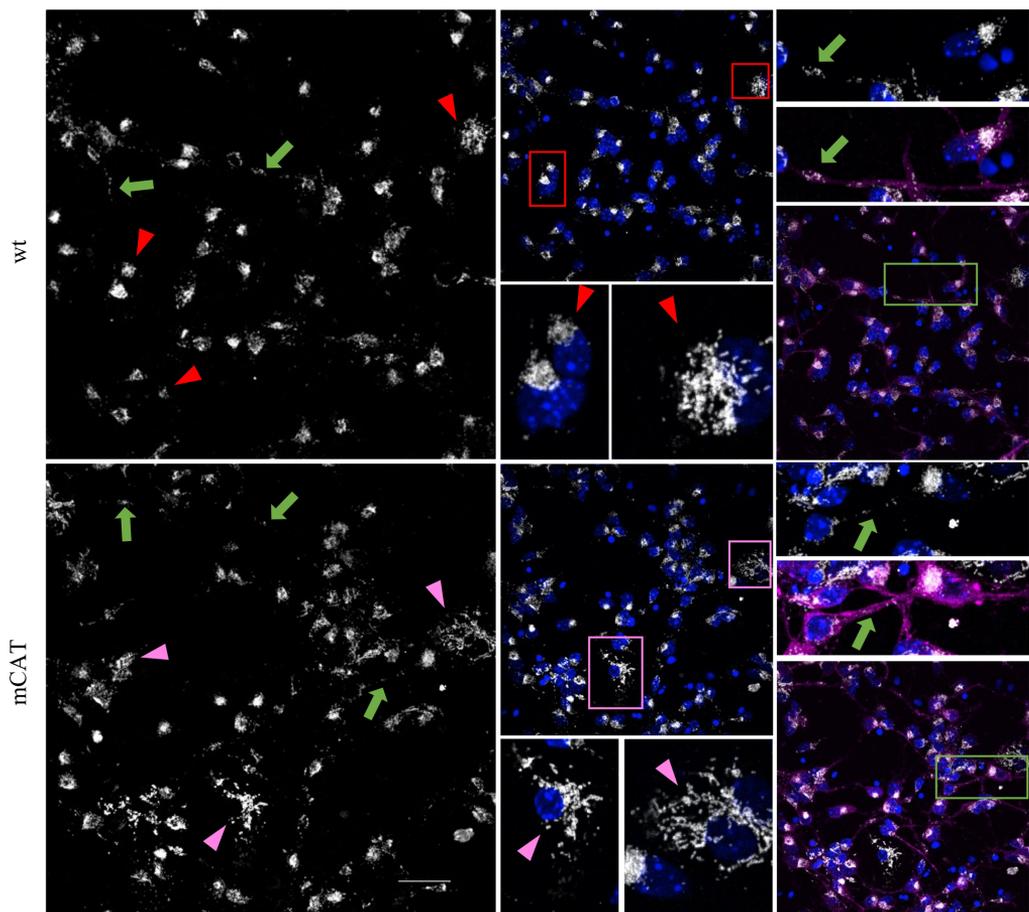


Figura 6. La reducción de las mROS modifica la morfología y la distribución de la red mitocondrial. Microfotografías de fluorescencia confocal que muestran las mitocondrias marcadas con TOMM20 (gris), MAP2 (magenta) y DAPI (azul) a 3 DIV mediante el método de inmunocitoquímica. Se muestran distintas combinaciones de planos focales (en su proyección máxima). Las puntas de flecha rojas y rosas indican la localización de la red mitocondrial. Además, se observa una mayor tendencia de las mitocondrias wt a agruparse en la región perinuclear (puntas de flecha roja). Mientras que las mitocondrias mCAT presentan una red mitocondrial más extendida por toda la neurona (puntas de flecha rosa). Las flechas verdes indican las diferencias en el tráfico mitocondrial entre ambos genotipos. Barra de escala= 50 μ m.

Estos resultados, aunque preliminares, indican que la disminución de los mROS podría estar afectando a la dinámica mitocondrial. Sin embargo, se requieren análisis de la expresión de proteínas relacionadas con los procesos de fusión y fisión (Tilokani et al., 2018), con el fin de comprender mejor las diferencias observadas y conocer su implicación en los mecanismos de dinámica mitocondrial. Ello abre una nueva vía de investigación en el laboratorio, que abordaremos en el futuro.

Una vez confirmadas las diferencias entre las neuronas corticales wt y las mCAT en cultivo primario, nuestro siguiente abordaje, expuesto en el Bloque II, fue comprobar las posibles repercusiones fisiológicas de la reducción endógena de los mROS durante la formación de la corteza cerebral.

II. BLOQUE 2

1. La reducción de las mROS no altera el tamaño de la corteza cerebral

La morfología del cerebro adulto es el resultado de un delicado equilibrio entre la proliferación de progenitores neurales y el inicio de la neurogénesis en las etapas embrionarias del desarrollo (Di Bella et al., 2021). Un desbalance en este equilibrio origina las alteraciones en el desarrollo de la corteza cerebral (Delgado-Esteban et al., 2013, Bobo-Jiménez et al., 2017). Por este motivo, nosotros quisimos comprobar que ocurría en la corteza cerebral cuando se reducían las mROS endógenos durante el desarrollo. Para ello, se obtuvieron individuos procedentes de camadas que expresan ambos genotipos wt y mCAT, a diferentes días de edad embrionaria (E) y posnatal (P). En primer lugar, comprobamos que no había diferencias en los pesos de los animales entre ambos genotipos, a lo largo del desarrollo (**Figura 7**).

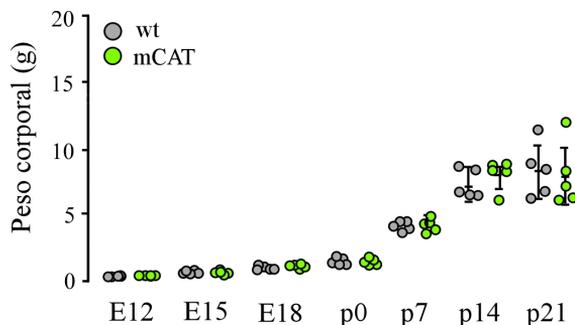


Figura 7. La reducción de las mROS no modifica el peso corporal de los animales. Los datos son medias \pm SEM; * $p < 0.05$ vs wt (test t-Student de un total de $n=3-5$ experimentos independientes).

Seguidamente, se decidió estudiar si existían diferencias estructurales en las cortezas cerebrales de los animales de ambos genotipos. En la **Figura 8**, se muestran secciones sagitales de la corteza cerebral de animales wt y mCAT a diferentes edades de las etapas embrionaria (E12, E15, E18) y postnatal (p0). Mediante la tinción de Nissl demostramos que no se existen alteraciones evidentes en el tamaño de la corteza cerebral entre ambos genotipos, a lo largo de las edades estudiadas.

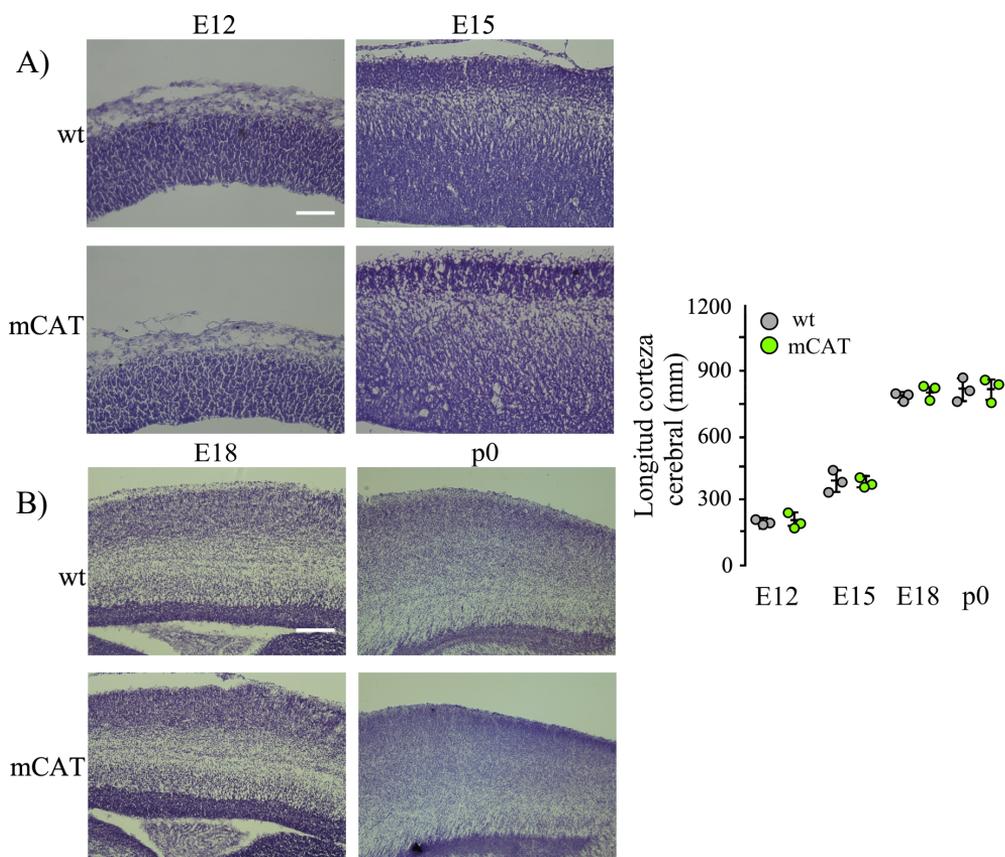


Figura 8. La reducción de las mROS in vivo no induce alteraciones en el tamaño de la corteza cerebral. Análisis de secciones sagitales de corteza mediante tinción de Nissl adquiridas mediante microscopia de campo claro. Imágenes representativas de ambos genotipos a diferentes edades. La cuantificación de la longitud de la corteza se realizó en 3 cortes de 3 animales diferentes para cada genotipo. Barra de escala, A= 100 μ m, B= 200 μ m.

2. La reducción endógena de las mROS altera la diferenciación y la proliferación celular, lo que desestructura la corteza cerebral

Una vez comprobado que no existen diferencias en el tamaño de la corteza cerebral entre los animales mCAT y wt, decidimos estudiar la organización de las células en las capas de la corteza cerebral, a lo largo de los días del desarrollo embrionario (E12, E15, E18) y posnatal (p0).

2.1 La reducción de las mROS altera la diferenciación de los progenitores neurales

En primer lugar, analizamos el grado de diferenciación de las NPCs, mediante marcajes específicos, como son Nestin, marcador de células progenitoras, TUJ1, marcador de neuronas inmaduras, y MAP2, marcador de neuronas maduras. Así, comprobamos que en el E12 no existen diferencias en los marcadores Nestin y TUJ1 (**Figura 9A**). Sin embargo, se observaron diferencias entre ambos genotipos a partir del E15. Concretamente, se observó una acumulación desorganizada de las células TUJ1 positivas en la región de la corteza cerebral conocida como interzona (IZ), región clave de la estructura de la corteza cerebral implicada en la coordinación del proceso de diferenciación neuronal (Molnar et al., 2019) (**Figura 9B**).

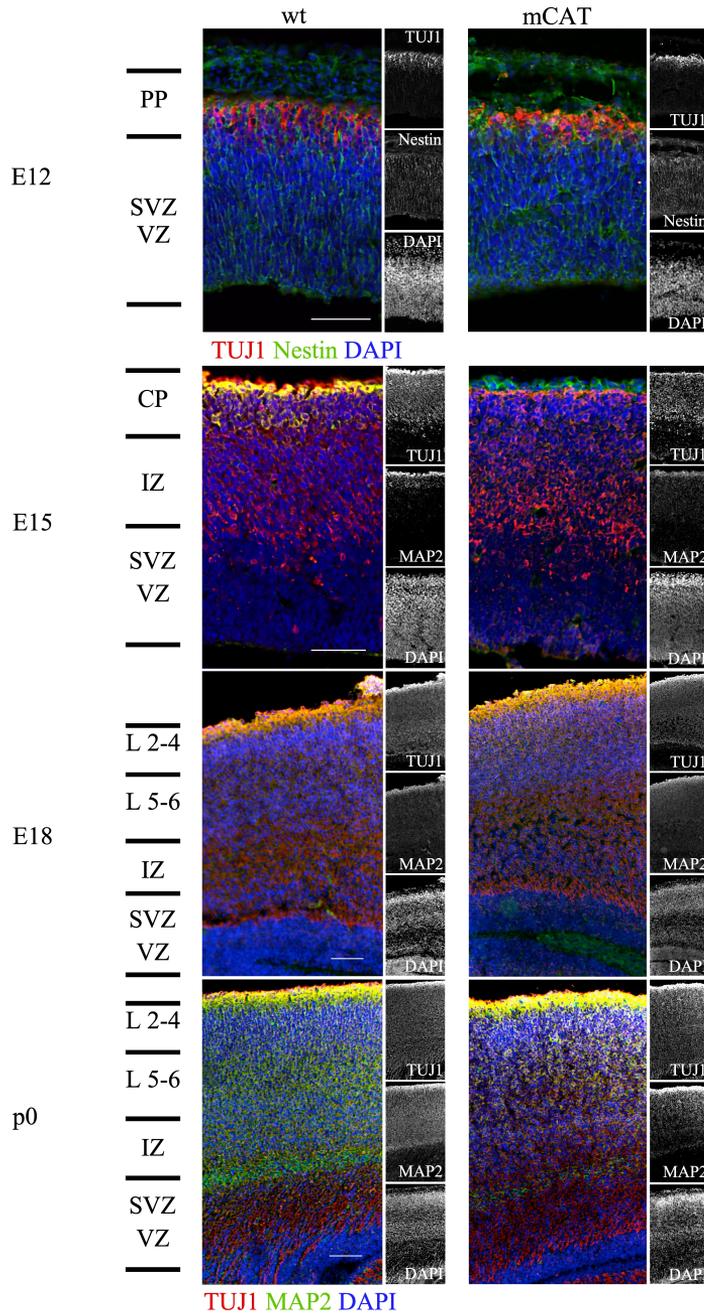


Figura 9. La reducción de las mROS endógenas promueve la desorganización celular de la corteza cerebral. Imágenes representativas de microscopía confocal procedentes de 4 cortes diferentes de 3-4 camadas de animales diferentes y a distintos días de edad E12, E15, E18 y p0. Tras la tinción con: **A)** Nestin (verde), TUJ1 (rojo) en E12 y **B)** MAP2 (verde), TUJ1 (rojo) en E15, E18 y p0. Escala = 100 μ m.

De hecho, pensamos que la acumulación celular observada en la IZ, en el E15 mCAT, pero no en el wt, estaría desestructurando la corteza cerebral al provocar la desorganización de las diferentes capas de la corteza cerebral mostradas en etapas posteriores E18 y p0 (**Figura 9**).

Con el fin de profundizar en la identificación de la función de las ROS en la organización de la corteza cerebral durante el desarrollo, decidimos analizar la proteína TBR2, así como STAB2 y CTIP2. Tal y como hemos comentado en la introducción, TBR2 es un factor de transcripción que juega un papel crucial en el desarrollo de la corteza cerebral, concretamente está involucrado en la amplificación de las NPCs, controlando la producción de los precursores intermedios o IPCs e influyendo en su diferenciación hacia tipos específicos o especializados de células corticales (Hevner, 2019; Lv et al., 2019). Por otro lado, detectamos SATB2, un marcador posmitótico para las neuronas de la capa superior en el neocórtex, y CTIP2, un marcador que se expresa preferentemente en las neuronas de la capa V (Eguren et al., 2013). Tal y como se observa en la **Figura 10**, el marcaje de células TBR2⁺ en la zona VZ/SVZ, de los animales mCAT indica que existe una desorganización de los precursores intermedios, respecto a los wt. Además, los marcajes con CTIP2 (capa V) y SATB2 (capa CP), confirman la existencia de dicha desorganización de la corteza cerebral cuando se reducen los niveles de mROS endógenos. La diferente disposición de las neuronas postmitóticas marcadas con el anticuerpo SATB2 confirma esta desorganización.

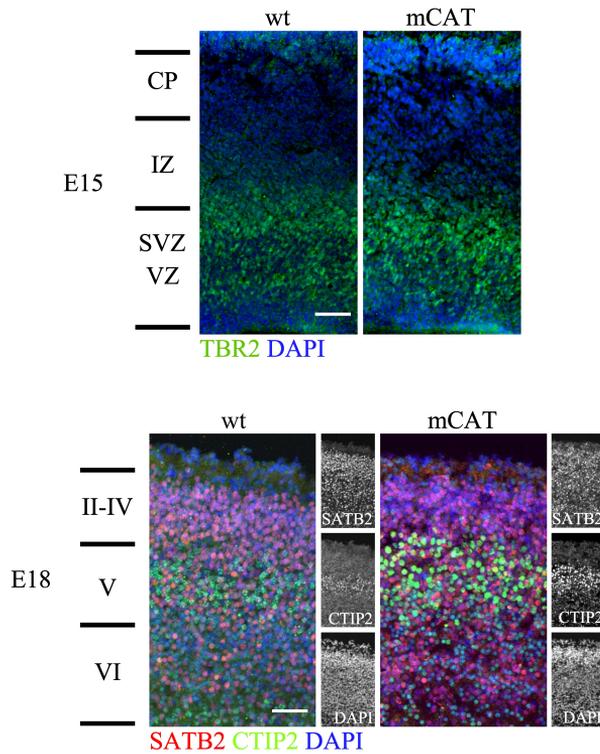


Figura 10. La reducción de los mROS provoca desorganización de la corteza cerebral. Imágenes representativas de microscopía confocal de animales E15 (A) tras la tinción con el marcador de progenitor neural TBR2 (verde), así como E18 (B) con marcaje SATB2 (rojo) y CTIP2 (verde). Barra de escala 100 μm .

Estos resultados demuestran que la reducción endógena de las mROS altera la diferenciación neuronal, así como la localización de las neuronas recién formadas, lo que provoca la desestructuración de la corteza cerebral.

2.2 La reducción endógena de las mROS altera la proliferación de los progenitores neurales

Uno de los procesos clave en la neurogénesis y organización de la corteza cerebral, es el control de la proliferación de las NPCs, que adquiere especial importancia a la edad de E12. (Takeuchi and Nakamura, 2014). Por este motivo, nuestro siguiente objetivo fue analizar la presencia de células que incorporan Bromodesoxiuridina (BrdU), marcador de fase S del ciclo celular. En la **Figura 11** se observa que no existen cambios significativos en el porcentaje de células BrdU⁺ a E12, lo que demuestra que no hay diferencias en la proliferación de las NPCs entre ambos genotipos.

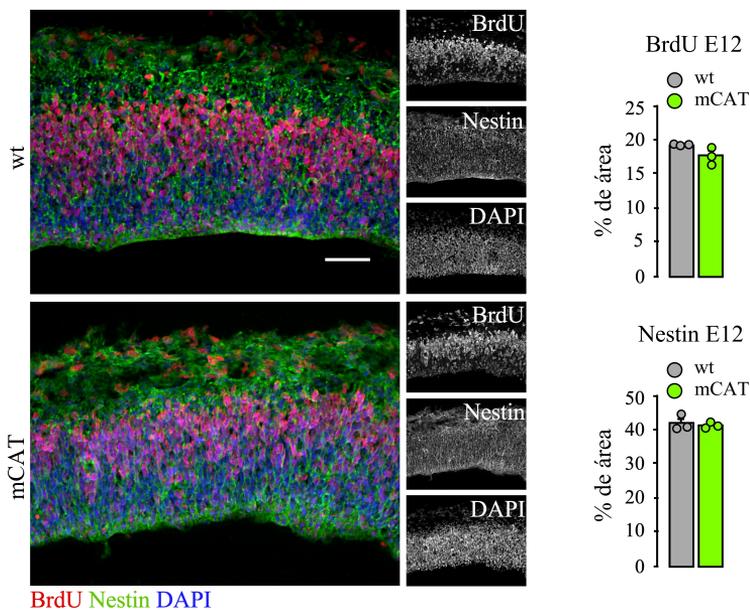


Figura 11. La disminución endógena de las mROS no altera la proliferación de las células de la corteza cerebral en el E12. Imágenes representativas adquiridas mediante microscopia confocal tras la tinción con BrdU (rojo), Nestin (verde) y marcador nuclear DAPI. Las cuantificaciones se han realizado en 3 cortes de 3 animales y de 3 capas diferentes. Barra de escala = 50 μ m.

Posteriormente analizamos el número de células BrdU positivas a E15, momento en que la neurogénesis aún es activa (Kriegstein and Buylla, 2009) y que coincide con la etapa donde observamos diferencias en la organización de la corteza cerebral (**Figura 9**). Mediante este análisis observamos una reducción significativa en el número de células BrdU⁺ (**Figura 12**), que se sigue manteniendo a la edad de E18 (**Figura 13**).

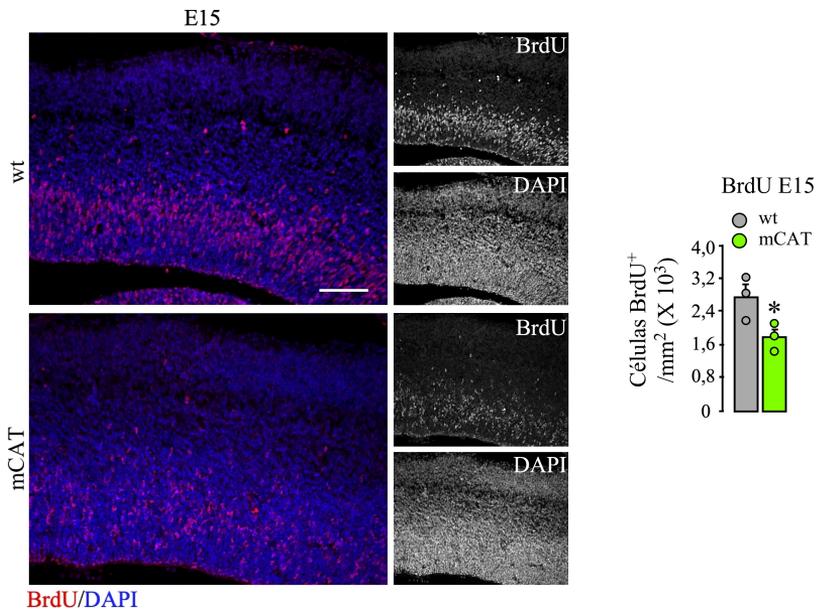


Figura 12. La reducción endógena de las mROS disminuye la proliferación celular en la corteza cerebral a E15. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal tras la tinción con BrdU (rojo) y marcador nuclear DAPI (azul). Las cuantificaciones se han realizado en 3 cortes de 3 animales de ambos genotipos (wt y mCAT) de 3 camadas diferentes. Escala = 100 μ m

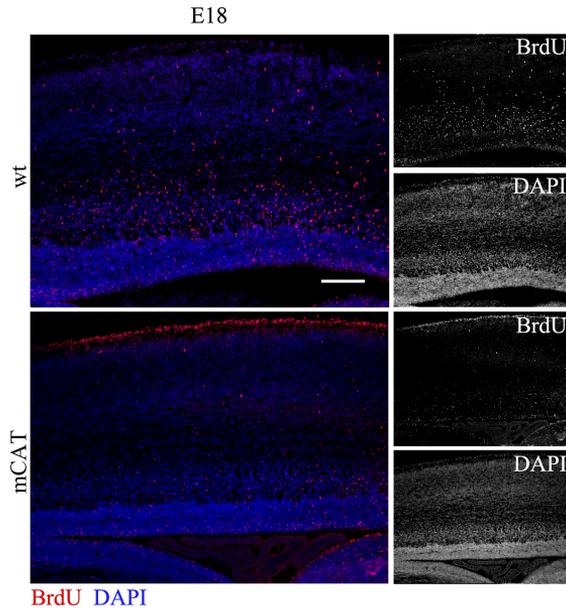


Figura 13. . La reducción endógena de las mROS disminuye la proliferación celular en la corteza cerebral a E18. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal tras la tinción con BrdU (rojo) y marcador nuclear DAPI (azul). Escala = 100 μ m

A continuación, y una vez comprobada que en la corteza cerebral de los animales mCAT existe una alteración en la proliferación, realizamos inmunohistoquímicas para detectar fosfo-histona H3 (pH3), marcador que nos informa del porcentaje de células en fase G2/M.

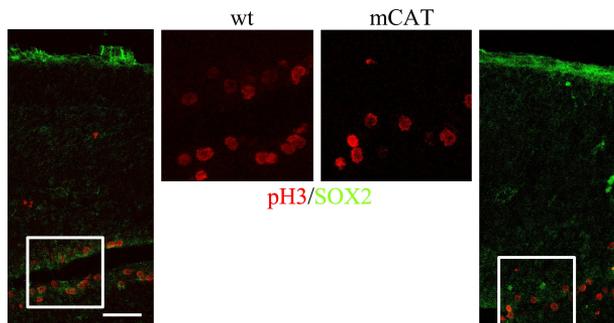


Figura 14. La reducción endógena de las mROS provoca una disminución en el número de células en fase G2/M del ciclo celular en la VZ del E15. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal tras la tinción con pH3 (rojo) y SOX 2 (verde) de embrión de E15. Escala =100 μ m

Hasta el momento, nuestros resultados demuestran que las mROS desempeñan un papel clave en la regulación de la proliferación de los NPCs, la diferenciación neuronal y, con ello, la organización de la corteza cerebral durante el desarrollo del cerebro.

Con objeto de profundizar en los mecanismos que participan en la diferente proliferación y diferenciación causada por la disminución de las mROS, utilizamos cultivos de neuroesferas, que se describen en el siguiente Bloque III.

III. BLOQUE 3

1. La reducción endógena de los mROS induce cambios morfológicos en las neuroesferas

Con objeto de comprender mejor los mecanismos implicados en los resultados arriba descritos, pusimos a punto un cultivo primario de neuroesferas de hemisferios corticales de ratón de 14,5 días, (Apartado 2 Material y Métodos). Las células se sembraron, se mantuvieron en cultivo y realizamos su seguimiento a 3 DIV y 6 DIV (días *in vitro*). Como se muestra en la **Figura 15**, las neuroesferas aumentan su tamaño a lo largo de los días en cultivo, llegando a tener un diámetro medio de 80 μm aproximadamente a los 6 DIV, lo que confirma la validez y establecimiento del modelo de neuroesferas primarias corticales.

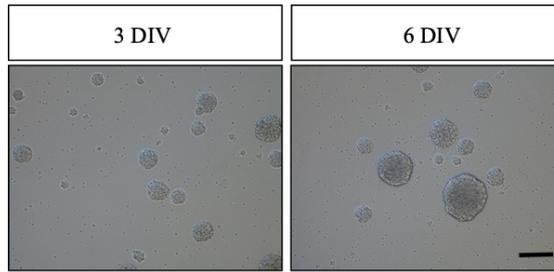


Figura 15. Morfología de las neuroesferas primarias cultivadas a partir de cortezas de ratón E 14,5. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases de las neuroesferas a 3 y 6 días en cultivo. Barra de escala = 80 μm .

Una vez puesto a punto el cultivo de neuroesferas, se analizó la morfología que presentaban ambos genotipos (wt y mCAT) a los 6 DIV. Se adquirieron imágenes de campo claro por microscopía y se determinó su diámetro. En la **Figura 16** se muestra que las neuroesferas con genotipo mCAT presentaron un menor diámetro medio, respecto a las wt. Es más, el porcentaje de neuroesferas pequeñas (20-50 μm) resultó ser mayor, mientras que el de las neuroesferas de 50-80 μm y, sobre todo, de 80-110 μm , fue menor en los cultivos mCAT, en comparación con los wt.

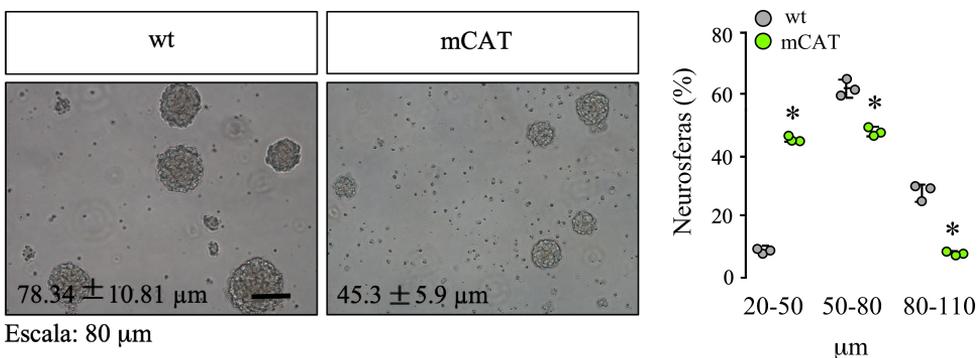


Figura 16. La reducción de las mROS endógenas disminuye el tamaño de las neuroesferas a los 6 DIV. Imágenes representativas de microscopía de campo claro de las neuroesferas wt /mCAT a 6 días en cultivo (izq.). Cuantificación del diámetro de las neuroesferas agrupándolas en tres grupos: (20-50 μm , 50-80 μm , 80-110 μm) (dcha.). Los datos son medias \pm SEM * $p < 0.05$ (test Anova de dos vías, $n = 3$ cultivos diferentes). Barra de escala = 80

Por tanto, observamos diferencias significativas en el tamaño de las neuroesferas formadas en cultivo, entre ambos genotipos.

2. La expresión de la catalasa en la mitocondria (mCAT) es un sistema eficiente para reducción endógena de los niveles de ROS celulares y mitocondriales

Posteriormente, decidimos analizar la eficacia del modelo utilizado, mediante la determinación de los niveles de las ROS celulares y mitocondriales por citometría de flujo y fluorimetría. Como se ha mencionado en la introducción, el principal tipo de ROS de origen mitocondrial es el $O_2^{\cdot-}$, producido principalmente en los complejos I y III de la CTE mitocondrial. Por ello, para detectar específicamente el $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial se utilizó la sonda MitoSOX™ Red. Se analizaron tanto los niveles de MitoSox en condiciones basales, como en presencia de inhibidores de la CTE, como son la Rotenona (inhibidor del Complejo I) y la Antimicina A (AA, inhibidor del Complejo III). En la **Figura 16** se muestra que las neuroesferas mCAT presentaron una tendencia en la reducción de los niveles de $O_2^{\cdot-}$, respecto a los wt. Es más, la expresión de catalasa en la mitocondria previene el incremento de los niveles de ROS inducidos por rotenona o AA (**Figura 17**).

Posteriormente, se determinaron los niveles de H_2O_2 tanto en extracto celular como en mitocondrias aisladas, mediante el uso la sonda AmplexRed. Los análisis de fluorimetría, mostraron que, en condiciones basales, tanto las mitocondrias como el extracto celular total de las neuroesferas mCAT tenían menores niveles de H_2O_2 , que las wt (**Figura 17**).

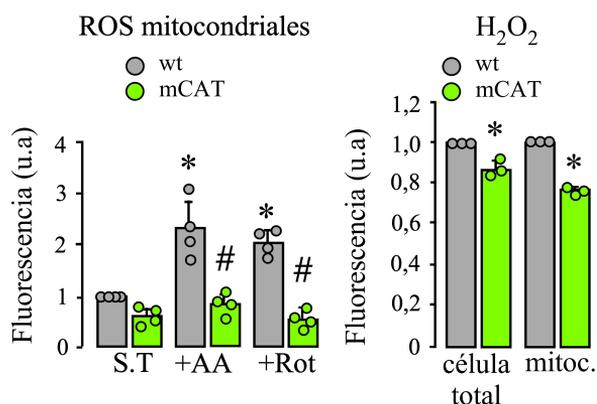


Figura 17. La expresión de la mCAT disminuye los niveles de ROS endógenos en las neuroesferas primarias. El análisis de los mROS ha sido realizado por citometría de flujo utilizando la sonda MitoSox Red® en ambos genotipos (izq). Se utilizó la sonda AmplexRed® para determinar la producción de peróxido de hidrógeno tanto en célula total como en mitocondrias intactas (dcha.). En ambos casos los valores se normalizaron frente a la condición control sin tratar (ST) o célula total en el wt, respectivamente. Los datos son medias \pm SEM * $p < 0.05$ (test Anova de dos vías; $n = 3-4$ cultivos diferentes).

Estos resultados demuestran que las neuroesferas mCAT reducen significativamente los niveles endógenos de ROS, lo que pone en avala la eficacia del modelo, no sólo para el estudio del papel fisiológico de las ROS en condiciones basales, sino también como una herramienta genética para combatir el estrés oxidativo en modelos que simulan alteraciones que afectan la función cerebral.

3. La reducción endógena de las mROS no induce la muerte celular por apoptosis

Como se ha detallado en la introducción, las ROS tienen una importante función como moléculas de señalización, un proceso que recibe el nombre de biología redox. La biología redox sostiene que se requieren pequeños cambios en ciertas etapas del desarrollo, en los niveles de ROS, para activar vías de señalización en las que las ROS funcionarían como segundos mensajeros en estas cascadas de

señalización (Sies et al., 2017). Una de estas vías es la apoptosis (Circu and Aw 2010; Li et al. 2003). Dado el menor tamaño de las neuroesferas mCAT (**Figura 16**), quisimos analizar si el efecto era debido a un incremento de la apoptosis de las NPCs que forman las neuroesferas.

La apoptosis de la NPCs se detectó mediante el marcaje anexina $V^+/7\text{-AAD}^-$ y posterior análisis, mediante citometría de flujo. No se observaron diferencias significativas en la apoptosis celular, siendo muy baja en ambos genotipos (**Figura 16**). Estos resultados indican que la disminución del diámetro de las neuroesferas mCAT (**Figura 16**) no era debido a un posible aumento en la apoptosis. Así, la disminución endógena de los niveles de mROS no compromete la supervivencia de las NPCs.

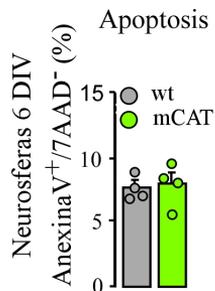


Figura 18. La disminución de los niveles endógenos de mROS no provoca apoptosis celular. Análisis de la apoptosis por citometría de flujo mediante la determinación de células Annexina V^+ /7AAD $^-$, por citometría de flujo. Los datos son medias \pm SEM * $p < 0.05$ vs control; (test t -student; $n = 4$ cultivos diferentes).

4. La reducción endógena de las mROS disminuye la proliferación de las NPCs

El control de la proliferación, en especial el de las NPCs es otra de las vías en las que los ROS mitocondriales ejercen un papel fundamental (Le Belle et al., 2011;

Bigarella et al., 2014). De hecho, hemos comprobado, in vivo, que la reducción de mROS reduce la proliferación de las células que componen la corteza cerebral, lo que promueve la desorganización de sus capas (**Figuras 9-10**). A través de la incorporación de BrdU, se evaluó la proliferación celular en las neuroesferas mCAT y wt. El BrdU incorporado por las neuroesferas, durante la fase de síntesis de ADN del ciclo celular, se marcó específicamente con un anticuerpo fluorescente anti-BrdU y se analizó mediante inmunocitoquímica. Los resultados muestran una reducción en el porcentaje de células BrdU⁺ en las neuroesferas mCAT respecto a las wt, lo que indica menos proliferación y podrían explicar el fenotipo de reducción de tamaño de las neuroesferas mCAT (**Figura 19**).

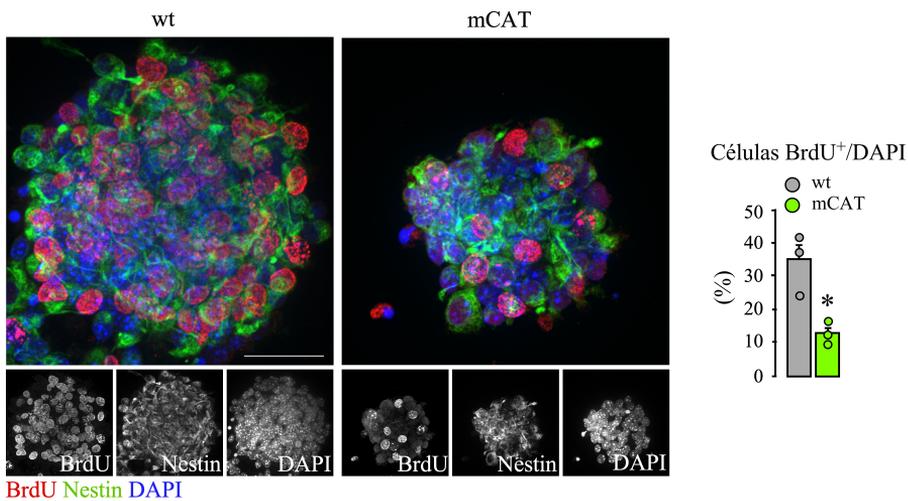


Figura 19. La reducción endógena de los mROS disminuye la proliferación en las neuroesferas. Microfotografías representativas de microscopia confocal mostrando el marcador neural Nestin (verde), BrdU (rojo) y DAPI (azul) mediante inmunocitoquímica (izq). Cuantificación del porcentaje de células BrdU positivas frente a DAPI analizando 15 neuroesferas (6 DIV) por genotipo (dcha). Los datos son medias \pm S.E.M.; * $p < 0,05$ vs control (test t-Student; $n = 3$ experimentos independientes) Barra escala = $40 \mu\text{m}$.

Con objeto de estudiar con mayor detalle la proliferación celular, se determinó la distribución celular en las diferentes fases del ciclo celular, mediante tinción con

IP y posterior análisis por citometría de flujo. la tinción con el IP permite distinguir las células en la fase G0/G1 del ciclo celular, que tienen una cantidad diploide de ADN, de las células en las fases S y G2/M, que tienen una cantidad de ADN mayor debido a la replicación y división celular (Pozarowski and Darzynkiewicz, 2004). Así, como se muestra en la **Figura 20**, las NPCs que forman las neuroesferas mCAT presentaron un mayor porcentaje de células en fase G0/G1, así como una reducción en las fases S y G2/M.

Estos resultados demuestran que la reducción de las mROS disminuye la proliferación de las NPCs, ya que presentan una mayor proporción de células en la fase G0/G1. Así, observamos una clara disminución de NPCs en fase S en las neuroesferas mCAT, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la corteza cerebral in vivo (**Figura 12**).

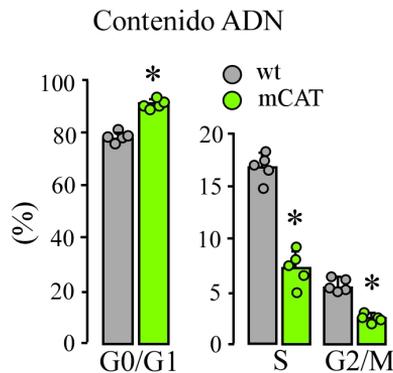


Figura 20. La reducción endógena de las mROS altera la progresión del ciclo celular de las NPCs que forman las neuroesferas. Análisis del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio (IP) por citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células en cada fase. Los datos son medias \pm S.E.M.; * $p < 0,05$ vs wt (test Prueba Anova de dos vías; $n=5$ experimentos independientes).

Con objeto de confirmar las diferencias en la proliferación celular, se analizaron los niveles de expresión de proteínas del ciclo celular, como PCNA, proteína implicada en la replicación del ADN, ciclina B1, proteína que se acumula en la fase G2/M, y CDH1, proteína implicada en la salida de mitosis y mantenimiento en la fase G0/G1 (Delgado-Esteban et al., 2013). Los resultados mostrados en la **Figura 21** reflejan que las neuroesferas mCAT poseen una menor expresión de PCNA y de CycB1, casi como una mayor expresión de CDH1, confirmando la menor proliferación de las NPCs mCAT, respecto a las wt.

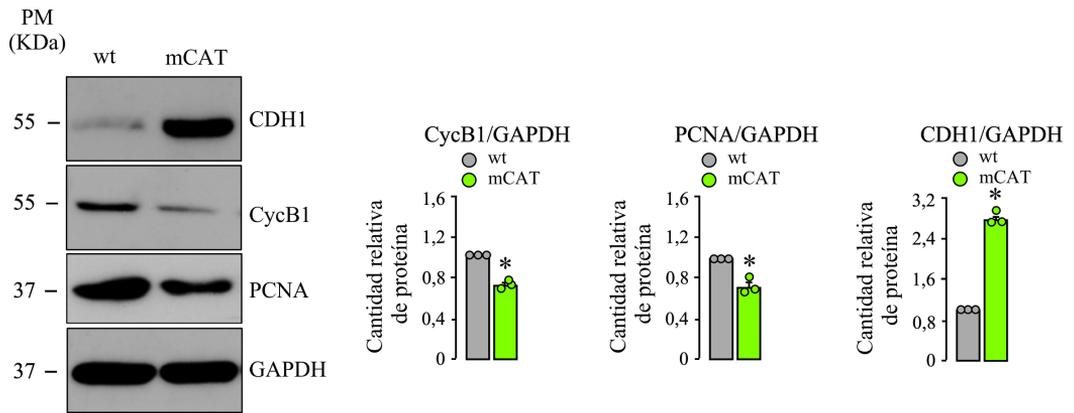


Figura 21. La reducción de las mROS disminuye los niveles de expresión de proteínas presentes en las fases S y G2/M del ciclo celular de las neuroesferas. Niveles de expresión de CDH1, CycB1 y PCNA analizados por Western Blot en neuroesferas a 6 DIV. La cuantificación se normalizó frente a la condición wt. La expresión de GAPDH se utilizó como control de carga. Los datos son medias \pm S.E.M.; * $p < 0,05$ vs wt (test t-Student; $n = 3$ experimentos independientes).

5. La disminución endógena de las mROS provoca senescencia celular

Hasta el momento, nuestros resultados han demostrado que las NPCs de las neuroesferas mCAT presentan alterada la progresión del ciclo celular, de manera que su capacidad proliferativa es menor que las wt. Esta alteración puede asociarse con un fenotipo de quiescencia o senescencia. En este sentido, tal y como hemos comentado en la introducción, recientes estudios han demostrado que el estrés oxidativo en células sanas provoca daño en el ADN y es capaz de inducir la senescencia celular (Kornienko et al., 2019).

La senescencia celular es un proceso que se define como un arresto del ciclo celular, en el cual las células no proliferan, sin embargo, el organismo no las elimina, sino que permanecen, de esta manera, viables y metabólicamente activas (Kumari and Tat, 2021). La senescencia celular se asocia a un acortamiento de los telómeros (Huang et al., 2022) y puede desencadenarse por una serie de estímulos negativos (erosión de telómeros, estrés oxidativo, estrés replicativo), que activan la respuesta al daño del ADN, una vía de señalización en la que las quinasas ATM o ATR bloquean la progresión del ciclo celular, a través de la estabilización de p53 (Kumari and Jat, 2021). En primer lugar, determinamos la longitud de los telómeros en las NPCs de neuroesferas a los 6 DIV, en ambos genotipos. Así, observamos (**Figura 22**) que las neuroesferas mCAT presentaron una disminución significativa de la longitud de los telómeros, respecto a las neuroesferas wt.

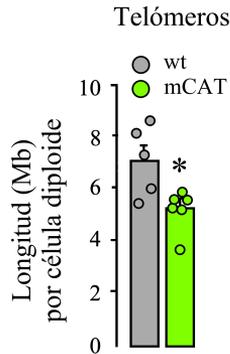


Figura 22. Las neuroesferas mCAT presentan telómeros más cortos que las wt. Análisis de la longitud telomérica mediante RT-qPCR. Los datos se expresaron como la longitud en Mb por célula diploide. Los datos son medias \pm S.E.M.; * $p < 0,05$ vs wt (test Prueba t-Student; $n = 5-6$ experimentos independientes).

Además, con objeto de confirmar la senescencia celular, analizamos la expresión de proteínas relacionadas con este proceso, como lo son la histona (γ -H2AX) y la vía p53-p21, mediante WB.

Tradicionalmente, la fosforilación de H2AX (γ H2AX) se ha asociado con el número de roturas de doble hebra en el ADN (DSBs; *double-strand break*) (Fernández-Capetillo et al., 2004). Trabajos anteriores de nuestro grupo han demostrado que el estrés oxidativo causa rotura de doble cadena (DSBs, *double strand breaks*) en el ADN de neuronas (Sanchez-Morán et al., 2020). Concretamente, la cantidad de γ H2AX se relaciona directamente con el número de DSBs, de modo que la detección de γ H2AX es un marcador de daño en el ADN (Delgado-Esteban et al. 2013). Los niveles de expresión de γ H2AX, así como los de p53 y p21, fueron mayores en las neuroesferas mCAT que en las wt (**Figura 23**).

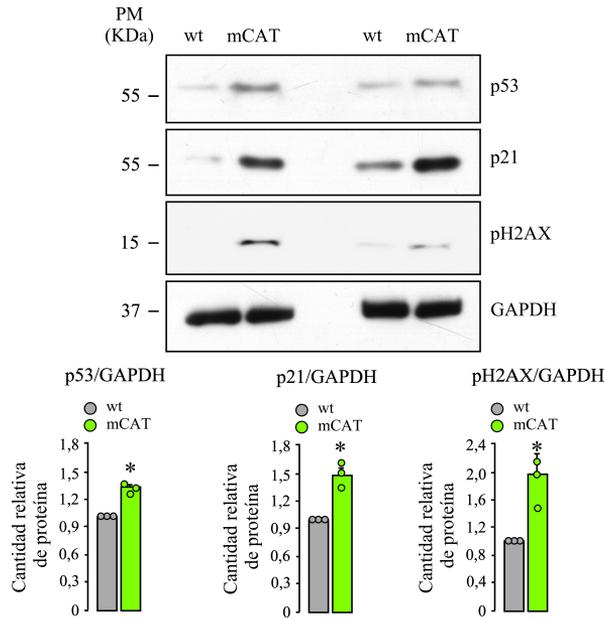


Figura 23. La reducción endógena de las mROS induce la senescencia celular en las neuroesferas. Niveles de expresión de las proteínas p53, p21, γ p2AX analizados por Western Blot de neuroesferas 6 DIV en 2 cultivos diferentes. La cuantificación se normalizó frente a la condición wt. La expresión de GAPDH se utilizó como control de carga. Los datos son medias \pm S.E.M.; * $p < 0,05$ vs wt (test Prueba t-Student; $n = 3$ experimentos independientes).

Todos estos resultados demuestran que las NPCs de las neuroesferas mCAT presentan un fenotipo senescente y, en consecuencia, un envejecimiento celular prematuro, lo que podría explicar la menor proliferación celular, respecto a las neuroesferas wt.

6. Las neuroesferas mCAT presentan una alta oxidación proteica global

La disminución de los niveles endógenos de mROS provoca daño de doble cadena en el ADN y senescencia, lo que es sorprendente, ya que esos procesos están relacionados con estrés oxidativo. Por tanto, analizamos el grado de oxidación de proteínas, como una primera aproximación de posible alteración redox, en ambos genotipos. En colaboración con el grupo de investigación del Profesor Quim Ros (Instituto de investigación, IRB de Lleida), se determinó la oxidación de proteínas mediante el análisis de los niveles de los grupos carbonilos, utilizando el método de 2,4 -dinitrofenilhidrazina (DNPH), ya que este compuesto se une covalentemente a estos grupos carbonilos, produciendo DNP (2, 4-dinitrofenol) (Alomari et al., 2018; Cabiscol et al., 2000). Así, comparamos las carbonilaciones en extracto proteico total de neuroesferas a los 6 DIV, mediante WB. Las muestras procedentes de neuroesferas mCAT tenían una mayor oxidación de las proteínas que las wt (**Figura 24**), lo que demuestra un estrés oxidativo en las NPCs mCAT, a pesar de la reducción endógena de las mROS (**Figura 17**).

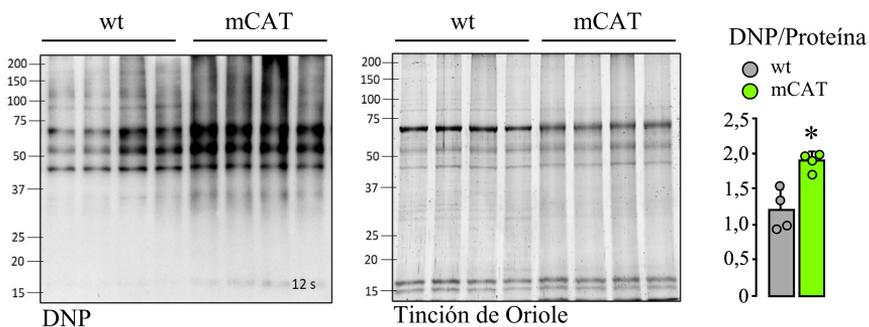


Figura 24. La reducción endógena de las mROS aumenta los niveles de oxidación proteica. Niveles de expresión de DNP, analizados mediante WB, en extractos procedentes de neuroesferas de 6 DIV. Se usó la Tinción de Oriole como control de carga. Los datos son medias \pm S.E.M.; * $p < 0,05$ vs control (test Prueba t-Student; $n = 4$ experimentos independientes).

7. La disminución endógena de los niveles de mROS incrementa la expresión de las NADPH oxidasas

Las NADPH oxidasas (NOX) son una fuente importante de ROS, siendo importantes reguladoras de la biología redox. Recientes trabajos han demostrado que la reducción endógena de las mROS en astrocitos modificaba la expresión de las NOX (Vicente-Gutierrez et al., 2019). Por tanto, y teniendo en cuenta la oxidación de proteínas detectada en las neuroesferas mCAT, decidimos evaluar si la reducción endógena de las mROS en las NPCs alteraba la expresión de las Nox y, con ellos, la homeostasis redox. Como se muestra en la **Figura 25**, la detección de los mRNA demostró que las neuroesferas mCAT tenían un incremento en la expresión de las NOX 1 y NOX2 (51 % y 30 %, respectivamente), pero no de la NOX4, respecto a las neuroesferas wt.

Teniendo en cuenta que NOX1 y NOX2, por su localización celular, generan $O_2^{\cdot-}$ extracelular, analizamos los niveles de éste. Los resultados mostraron que las neuroesferas mCAT liberaron mayores niveles de $O_2^{\cdot-}$ extracelular que las neuroesferas wt (**Figura 26**). Este aumento en la actividad de las NOX crea una situación de estrés oxidativo, lo que podría explicar la mayor oxidación de proteínas observado en las neuroesferas mCAT, respecto a las wt (**Figura 24**).

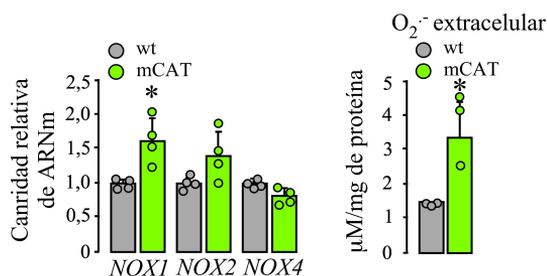


Figura 25. La reducción endógena de las mROS regula la expresión de las NADPH oxidasas, lo que aumenta la liberación de $O_2^{\cdot -}$ extracelular. Análisis de la expresión relativa de NOX1, NOX2 y NOX 4, en neuroesferas primarias a 6 DIV, mediante RT-qPCR. Se usó el gen GAPDH como housekeeping (izq). Análisis de la producción de $O_2^{\cdot -}$ extracelular mediante la reducción del cyt C, los datos se expresaron en $\mu M/mg$ de proteína (dcha). Los datos son medias \pm SEM; * $p < 0.05$ vs wt. (test t-Student de un total de $n=3-4$ experimentos independientes).

8. Las mROS endógenas modulan la defensa antioxidante

Hasta ahora, demostramos que la reducción endógena de las mROS, mediante la expresión de la catalasa en la mitocondria, modifica el equilibrio redox y provoca daño oxidativo por inducción de las NOX. Uno de los aspectos fundamentales en el control de este equilibrio redox es la defensa antioxidante. Por tanto, nuestro siguiente paso fue analizar la respuesta antioxidante en las neuroesferas mCAT. Para ello, analizamos, en primer lugar, la abundancia de glutatión, uno de los antioxidantes más abundantes en el cerebro y con gran implicación en la regulación de varios procesos celulares (Fernández-Fernández et al., 2018). Como se observa en la **figura 26**, el glutatión total de las neuroesferas mCAT fue menor que en las wt. Es más, los niveles de GSH (glutatión reducido) fue menor, mientras que la razón GSSG/GSH fue mayor en las neuroesferas mCAT, respecto a las wt. Todo ello confirma que las neuroesferas mCAT sufren estrés oxidativo.

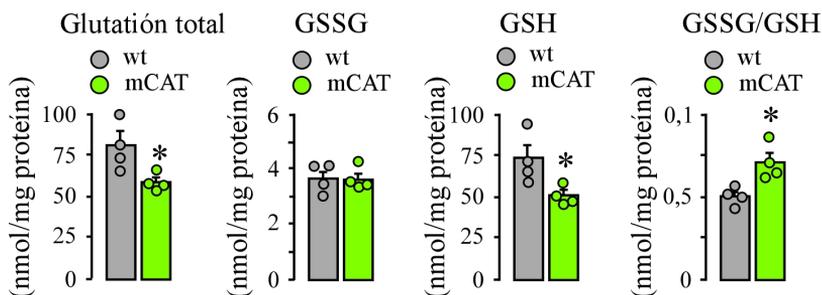


Figura 26. La reducción de las mROS modula los niveles de Glutathión. Se analizaron los niveles de Glutathión total, glutathión oxidado (GSSG), Glutathión reducido (GSH), la relación GSSG/GSH como índice oxidativo celular. Los datos son medias \pm S.E.M., * $p < 0,05$ vs control (test t-Student $n = 4$ experimentos diferentes).

Posteriormente, decidimos también analizar la vía antioxidante de NRF2 (*nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2*), otro de los principales moduladores del estado redox celular (Esteras et al. 2016; Hashimoto 2018; Sandberg et al. 2014). Además, la expresión génica de NOX-1 y NOX-2 está regulada por NRF2 (Pealyda and Natarajan, 2010). Dado que, las ROS estabilizan NRF2 y promueven su translocación nuclear y activación (Suzuki and Yamamoto, 2017), evaluamos la distribución subcelular de NRF2 en las NPCs de las neuroesferas mCAT y wt. Como se muestra en la **Figura 27**, la acumulación nuclear de NRF2 resultó ser menor, aunque no significativamente, en las células mCAT que, en las wt, lo que es compatible con una menor actividad del factor.

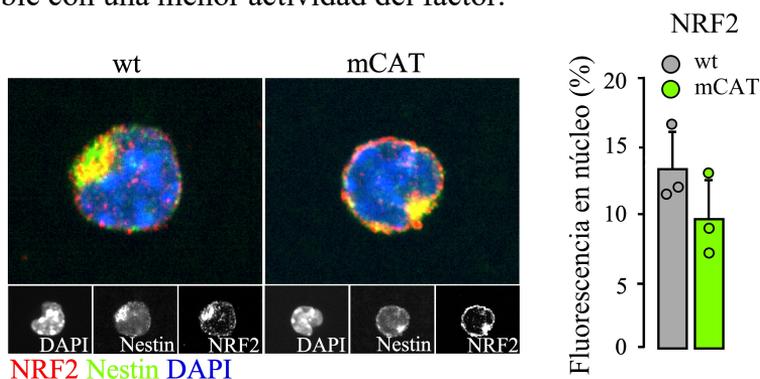


Figura 27. Las neuroesferas mCAT muestran una menor acumulación nuclear de NRF2, respecto a las wt. La cuantificación de la fluorescencia nuclear se llevó a cabo en 30 células en cada genotipo. Los datos son medias \pm S.E.M.; * $p < 0,05$ Prueba t de Student; $n = 3$ experimentos independientes.

Con el fin de investigar si la disminución de la localización nuclear de NRF2 en el genotipo mCAT estaba afectando a su actividad transcripcional, se determinaron los niveles de ARNm de NRF2 y varios de sus genes dianas, como son GLC_c (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit), HOM-1 (hemoxygenase-1) y NQO1 (NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1), mediante RT-qPCR. En la **Figura 28** se muestra que las neuroesferas mCAT presentaron niveles más bajos de HOM1 y NRO1, mientras que no se modificaron los niveles de NRF2 y de GCLc. La disminución en los niveles de expresión de HOM1 y de NQO1 demuestra la disminución de la actividad de NRF2 en las neuroesferas mCAT.

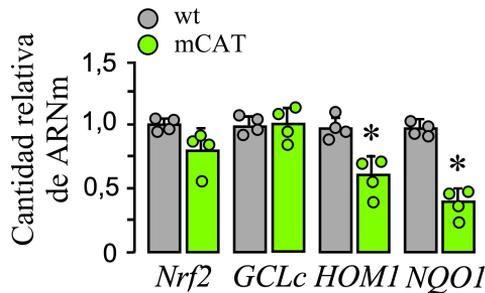


Figura 28. La disminución de las mROS reducen la actividad transcripcional de Nrf2. Análisis de la expresión relativa de *Nrf2* y sus genes diana mediante RT-qPCR en neuroesferas primarias 6DIV. Se usó el gen *gapdh* como control endógeno. Los datos son medias \pm SEM; * $p < 0.05$ vs wt; (test t-student $n=4$ experimentos independientes)

9. La reducción endógena de mROS no afecta a la migración celular de las neuroesferas primarias

Tras comprobar que las neuroesferas mCAT son fenotípicamente diferentes a las wt, también quisimos conocer si la disminución endógena de los niveles de las mROS, estaba alterando la migración celular, que es uno de los procesos fundamentales en el desarrollo de la corteza cerebral (. Para ello, las neuroesferas

primarias de 6 DIV se traspasaron a placas previamente tratadas con poli-L-ornitina y fibronectina, para facilitar su adhesión a la placa y, mediante microfotografías a diferentes tiempos, se analizó la migración celular. Aunque confirmamos el menor tamaño de las neuroesferas mCAT, respecto a las wt, no se observaron diferencias en la migración, que fue similar en ambos genotipos (**Figura 29**).

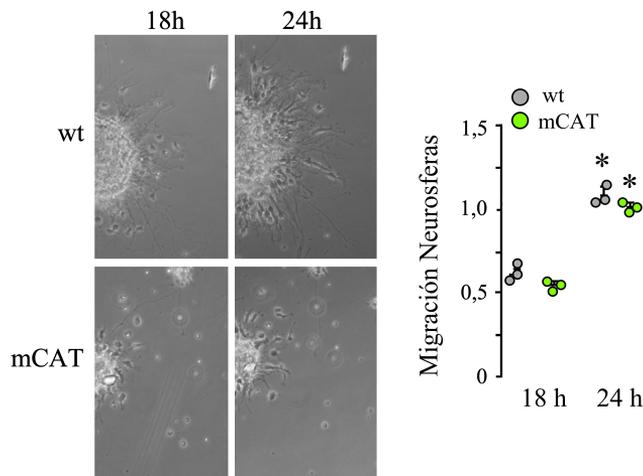


Figura 29. La reducción endógena de las mROS no afecta la migración celular de las neuroesferas. Las imágenes se adquirieron mediante microscopio de campo claro, a las 18 y 24 horas tras la siembra sobre poli-L-ornitina y fibronectina. La cuantificación se expresó en forma de ratio teniendo en cuenta el radio de migración, así como el radio inicial de la neuroesfera. Los datos son medias \pm SEM; * $p < 0.05$ vs wt; (test t-student $n=3$ experimentos independientes)

10. Los mROS afectan a la diferenciación neural

Como mostramos anteriormente, las mROS tienen un papel importante en el control del proceso de diferenciación neuronal, tanto en neuronas corticales en cultivo (**Figura 1 y 2**), como en el tejido cerebral de ratón (**Figura 9**). Por tanto,

quisimos estudiar la capacidad de diferenciación de las neuroesferas mCAT y wt, en los diferentes linajes neurales.

Para ello, las neuroesferas se disgregaron con acutasa y se sembraron en Matrigel (GelTrex), siguiendo el protocolo de diferenciación celular en neuroesferas primarias especificado en Material y Métodos (Apartado 14). Los análisis se realizaron a 4 tiempos diferentes: a los 6 DIV, en proliferación (P), y, una vez sembradas sobre el matrigel, a los 2, 3 (2 +1) y 5 (2 días + 3) DIV, siendo 2 DIV el tiempo en el cual al medio se le añadió suero fetal bovino (FBS) y se retiraron los factores de crecimiento. Se analizaron diferentes marcadores de diferenciación mediante RT-qPCR: *Ascl1* (progenitores neurales), *Tubb3* (neuronas), *Gfap* (astrocitos). Los resultados mostraron diferencias significativas en el marcador *Ascl1* y en *Tubb3* (**Figura 30**), sin alterar los niveles de expresión de *Gfap*. Así, observamos una reducción significativa de la cantidad de ARNm de *Ascl1* a (2, 2+1 DIV) y un aumento de la cantidad de *Tubb3* que es significativa a los (2+1 DIV). Estos resultados indican que la reducción endógena de las mROS altera el “pool” de progenitores neurales (Células *Ascl1*⁺), así como a la diferenciación neuronal (Células *Tubb3*⁺), de manera que existe una menor cantidad de precursores neuronales y una mayor cantidad de neuronas, lo que concuerda con la acelerada diferenciación neuronal de las NPCs mCAT, respecto a las wt.

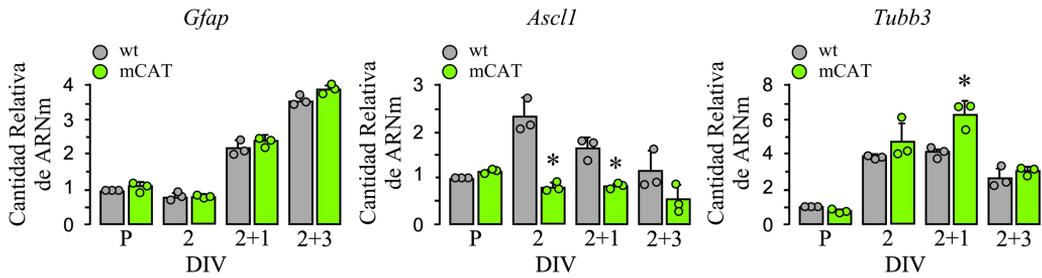


Figura 30. La reducción endógena de las mROS altera la diferenciación de los progenitores neurales. Análisis de expresión génica de neuroesferas en proliferación (P) y células en diferentes etapas de diferenciación (2, 2+1 y 2+3 días). Se muestran los patrones de expresión de *Ascl1* (progenitores neurales), *Tubb3* (neuronas), y *Gfap* (astrocitos). Todos los datos se normalizaron frente a la condición proliferativa wt (6P) y se usó *Gapdh* como gen endógeno. Los datos son medias \pm S.E.M, * $p < 0,05$ vs control (test Anova de dos vías $n = 3$ experimentos independientes)

Nuestros resultados, demuestran que la reducción endógena de las mROS endógenas provocan una clara alteración de los procesos de proliferación y diferenciación, sin afectar a la migración, de los progenitores neurales. Así, los mROS acelera la diferenciación neuronal, lo que claramente posiciona a las mROS como mediadores esenciales y reguladoras de las vías de señalización implicadas en el desarrollo de la corteza cerebral.

Discusión

La disminución de los ROS mitocondriales promueve la diferenciación neuronal y altera la organización de la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario

El tamaño y funcionamiento del cerebro adulto depende de la correcta generación de neuronas y desarrollo de la corteza cerebral, durante el periodo embrionario (Sun and Hevner, 2010). Durante las primeras etapas, se produce una intensa proliferación simétrica de las células progenitoras neurales (NPCs, *neural progenitor cells*), que tiene lugar en el ventrículo (VZ) y zonas subventriculares (SVZ) que revisten los ventrículos cerebrales. Posteriormente, las NPCs experimentan divisiones asimétricas, lo que permite la autorrenovación y la producción de células progenitoras intermedias, que formarán nuevas progenitoras y neuronas diferenciadas, hasta que la capacidad proliferativa se agota. Por tanto, la estructura final de la corteza cerebral, así como su funcionamiento, depende de la coordinación correcta entre la proliferación de las NPCs y el inicio de la neurogénesis, durante el periodo embrionario, lo que asegura la correcta generación de neuronas (Agirman et al., 2017; Kawabe and Brose, 2011). En este sentido, la E3 ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1 coordina la salida del ciclo celular de los progenitores con el inicio de la neurogénesis, que es esencial para el correcto tamaño de la corteza cerebral. Así, la falta de Cdh1 altera la progresión del ciclo celular en los progenitores, incrementando la fase S, y, en consecuencia, provoca estrés replicativo, lo que culmina en apoptosis celular mediada por p53. El resultado es una disminución del número de neuronas corticales generadas y, con ello, del tamaño de la corteza cerebral y microcefalia (Delgado-Esteban et al., 2013; Eguren et al., 2013). Recientemente, hemos identificado una nueva mutación de Cdh1 (Asp187Gly) en humanos que provoca la pérdida de función de APC/C-Cdh1 y causa microcefalia prenatal, retraso psicomotor y epilepsia severa

mediante un mecanismo que implica la pérdida de NPCs por apoptosis (Rodríguez et al., 2019). En el presente trabajo demostramos que los ROS mitocondriales desempeñan una importante función en la coordinación entre la proliferación de las NPCs y la diferenciación neuronal.

Así, la disminución endógena de los ROS mitocondriales, mediante un modelo murino que expresa la enzima catalasa en la mitocondria (mCAT), disminuye la proliferación de las NPCs, tanto *in vitro* como *in vivo*, y acelera la diferenciación de neuronas corticales *in vitro*. Ello indica que hay un cambio en la transición entre proliferación y diferenciación en los ratones mCAT, lo que puede afectar al correcto desarrollo de la corteza cerebral. De hecho, observamos un aumento en el número de células Tuj1⁺ (neuronas inmaduras) a E15, que se acumulan en la interzona (IZ) de la corteza cerebral, lo que es compatible con una neurogénesis acelerada, respecto a los WT. Es más, la disminución de las ROS mitocondriales altera la distribución de las capas de la corteza cerebral a partir de E18, a juzgar por la inmunodetección de TBR2, SATB2 y CTIP2. Cabe destacar que, en cultivos de neuroesferas, no se observaron diferencias en la migración de las NPCs entre ambos genotipos, por lo que la desestructuración de la corteza cerebral puede ser consecuencia de la prematura neurogénesis. En este sentido, el incremento en la generación de ROS causado por la falta de FBXL5 (F box and leucine-rich repeat protein 5), regulador de la homeostasis de hierro (Moroishi et al., 2011) o bien de PRDM16 (PR domain-containing 16), que regula el estrés oxidativo (Chuikov et al., 2010) incrementa la proliferación de las NPCs y disminuye la neurogénesis embrionaria, lo que resulta en una distribución errática de las capas de la corteza cerebral, sin alterar su tamaño (Yamauchi et al., 2017; Chui et al., 2020).

No se detectan diferencias anatómicas evidentes, ni alteraciones en el tamaño de la corteza cerebral, entre los animales WT y los mCAT, a pesar de las diferencias observadas en la proliferación de las NPCs y la diferenciación neuronal. Las diferencias en la proliferación de precursores *in vivo* las observamos a partir de los E15, pero no en los E12, momento en el que la neurogénesis ya se ha iniciado, lo que podría explicar la ausencia de microcefalia en el ratón mCAT. Así, a E12 se produce una activa proliferación de precursores (Mukhtar and Taylor, 2018) que podría ser suficiente para generar las neuronas necesarias para evitar la disminución de tamaño de la corteza. Es más, las neuroesferas procedentes de ratones mCAT E15,5 tienen menor contenido de progenitores neuronales (Ascl1), pero mantiene su capacidad de generar neuronas (Tubb3), que es incluso mayor en el primer día de diferenciación *in vitro*. Durante el desarrollo del SNC, se generan un alto número de NPCs, de manera que un tercio de estas células mueren por apoptosis al final de la gestación o primera semana después del nacimiento, con el objetivo de generar el número correcto de neuronas (Oppenheim, 1991; Kristiansen and Ham, 2014). En este sentido, las neuroesferas mCAT tienen un menor tamaño por su menor capacidad proliferativa, no porque sufran apoptosis. Es posible que las NPCs generados durante etapas tempranas del desarrollo sean más resistentes a la apoptosis, lo que podría explicar que los ratones mCAT tengan un número de neuronas normal. La acelerada diferenciación neuronal en los mCAT apoyaría esta hipótesis, ya que se iniciaría la neurogénesis antes, evitando así la microcefalia, si bien debemos realizar nuevos experimentos encaminados a demostrarla *in vivo*.

Durante el desarrollo embrionario, se produce un aumento progresivo de la generación de ROS y estrés oxidativo en la corteza cerebral de ratón, que llega a ser máxima entre los 15-17 días de gestación (Chui et al., 2020). De la misma

manera, se han detectado importantes cambios en genes involucrados en la regulación del estrés oxidativo, lo que evidencia la importancia de la homeostasis ROS en el desarrollo de la corteza cerebral (Chui et al., 2020). Es más, las NPCs y las neuronas diferenciadas poseen distintos perfiles redox, lo que sugiere que el estado redox regula el inicio de la diferenciación neuronal (Yan et al., 2015). En este trabajo describimos que las neuronas mCAT diferencian más rápidamente que las WT. Esta diferenciación prematura, puesta de manifiesto mediante la detección de los marcadores dendríticos, Map2 y Tuj1 y axonal, Tau, se detecta ya desde el primer día de cultivo. Es más, la actividad neuronal en las neuronas mCAT es superior a lo observado en neuronas WT, lo que concuerda con el mayor estado de diferenciación de sus neuritas. Sin embargo, a los 12 días de cultivo, la reducción de los niveles endógenos de ROS mitocondriales provocó la disminución de los marcadores neuronales, tanto dendríticos como axónicos, lo que es compatible con una alteración del citoesqueleto neuronal y un posible envejecimiento prematuro de las neuronas. Nuestros resultados concuerdan con anteriores que describen que la eliminación del H₂O₂ generado en el retículo endoplásmico provoca la diferenciación prematura de neuronas motoras, mediado por un desequilibrio redox y la regulación negativa de la señalización de Notch en estas células, lo que acelera la muerte neuronal (Yan et al., 2015).

Recientemente, se ha demostrado que la dinámica y el metabolismo de las mitocondrias son diferentes durante la diferenciación de las neuronas corticales. En las neuronas recién nacidas, hay menos mitocondrias y tienen menor actividad metabólica, pero aumentan gradualmente durante la maduración neuronal. Así, un mayor metabolismo mitocondrial neuronal conduce a una diferenciación acelerada, que incluye una mayor complejidad, excitabilidad y función sináptica de las neuritas. Es más, la disminución en el consumo de oxígeno mitocondrial

desacelerara el desarrollo neuronal (Iwata et al., 2013). Aunque, no observamos diferencias en el número de mitocondrias entre neuronas WT y mCAT, estas presentan diferente localización intracelular. Así, las mitocondrias de las neuronas WT se localizan mayoritariamente en la zona perinuclear, mientras que en las neuronas mCAT se distribuyen por todo el soma neuronal, incluso en las neuritas. Además, las neuronas mCAT son más grandes y presentan una morfología menos fragmentada que las WT, lo que es compatible con un mayor consumo de oxígeno. que podría explicar la rápida diferenciación de las neuronas mCAT, respecto a las WT. Además, la distribución perinuclear de las mitocondrias en las células crea una barrera para que el O₂ acceda al núcleo nuclear, lo que podría afecta a patrones transcripcionales implicados en proliferación y diferenciación, así como en estabilidad genómica (Caroso, 2019; Mori et al., 2023). De hecho, en neuronas inmaduras, con menor grado de diferenciación, las mitocondrias se sitúan, fundamentalmente en la región perinuclear, mientras que, en neuronas diferenciadas, que presentan una mayor red neurítica, la distribución nuclear disminuye y las mitocondrias se translocan a lo largo de las neuritas (Cheng et al, 2010) como ocurre en las neuronas mCAT.

Finalmente, observamos un importante incremento de la actividad neuronal en los mCAT a lo 6 días de cultivo. En este sentido, la hiperactividad neuronal es un sello característico de envejecimiento cerebral, incluso de neurodegeneración en etapa temprana, especialmente en la enfermedad de Alzheimer. Así, las regiones del hipocampo con actividad neuronal elevada no pueden almacenar nueva información en ratas envejecidas, lo que promueve deterioro cognitivo. Por tanto, la elevada actividad neuronal, junto con la pérdida de marcadores neuríticos, sugieren un envejecimiento prematuro de las neuronas mCAT a los 12 días de cultivo, lo que disminuye la plasticidad sináptica neuronal.

Nuestros resultados demuestran la importancia de los ROS mitocondriales en la diferenciación y actividad neuronales. Es importante resaltar que la reparación cerebral tras un ictus requiere la activación de la plasticidad sináptica y de la neurogénesis. De hecho, la terapia antioxidante ha fracasado en su traslación a la práctica clínica en el tratamiento del ictus. Así, los ROS mitocondriales podrían ser necesarios para activar estos mecanismos de reparación cerebral tras un ictus, lo que finalmente condiciona el estado funcional de los pacientes (Rodríguez et al., 2018].

Los ROS mitocondriales modulan la proliferación y la senescencia de los precursores neurales embrionarios

Las NPCs poseen niveles altos de ROS y responden rápidamente a situaciones de estrés oxidativo, lo que les permiten mantener una alta velocidad de autorrenovación (Hwang et al., 2020). Nuestros resultados demuestran que la disminución de las ROS mitocondriales disminuye la capacidad proliferativa de las NPCs embrionarias, tanto *in vitro* como *in vivo*, sin que ello afecte a la viabilidad celular. Así, las neuroesferas mCAT presentan una mayor proporción de células en fase G0/G1, así como una disminución de los niveles de ciclina B1 y PCNA, mientras que Cdh1 se acumula, respecto a los WT. Recientemente, Kirova y colaboradores (Kirova, et al., 2022) demostraron que fluctuaciones en la generación de las ROS durante la progresión del ciclo celular, de manera que los niveles de ROS aumentan en la transición de G1 a S, siendo los ROS mitocondriales necesarios para la entrada de las células en fase S y replicación del ADN en células proliferativas (Kirova, et al., 2022). De acuerdo con estos resultados, las NPCs de las neuroesferas mCAT poseen niveles bajos de PCNA

(marcador fase S) y menor número de precursores en fase S, respecto a los WT, lo que confirma que los ROS mitocondriales también son necesarios para la proliferación de las NPCs.

La estimulación de la proliferación por ROS en los NPCs se ha relacionado fundamentalmente con el H₂O₂ derivado de la actividad de las NOX (Holmström and Finkel, 2014), de manera que el H₂O₂ activa receptores tirosina quinasa de membrana e inhibe fosfatasa, lo que inicia señales transcripcionales que promueven las transiciones de G₀/G₁ y G₁/S (Burhans and Heintz, 2009; Chiu and Dawes, 2012). Específicamente, las NOX2 y NOX4 son necesarias para la proliferación de las NSCs, mediante la producción de H₂O₂ y la activación de la vía PI3K/AKT, por lo que una producción basal de ROS es necesaria para la proliferación de estas células (Le Belle et al., 2011; Holmstrom and Finkel, 2014; Nayernia et al., 2017). La disminución de los niveles mitocondriales de ROS se acompaña de la inducción de la expresión de NOX 1 y NOX2, pero no de NOX4, así como un incremento importante de la formación de O₂⁻ extracelular en las NPCs mCAT, respecto a las WT. Por tanto, la actividad de las NOX no parece afectar a la proliferación de las NPCs mCAT, aunque sí podrían ser las responsables del estrés oxidativo que sufren estas células, a juzgar por la disminución de los niveles de glutatión, el aumento de la ratio GSSG/GSH y la alta oxidación de proteínas celulares.

El factor NRF2 regula la expresión de NOX 1 y NOX2 y, con ello, los niveles extracelulares de O₂⁻ (Kovac et al., 2015). La disminución de la actividad de NRF2 en las NPCs mCAT es responsable del estrés redox creado por las NOX, como ya demostramos recientemente en astrocitos (Vicente-Gutierrez et al., 2019). Por tanto, la regulación de la homeostasis redox en las NPCs requiere la

coordinación de los ROS mitocondriales y los ROS extracelulares, ya que ambos están acoplados a través de la vía de señalización de NRF2.

A pesar de la alta actividad de las NOX, las NPCs mCAT no tienen alta capacidad proliferativa, como era de esperar (Le Belle et al., 2011; Holmstrom and Finkel, 2014). Por el contrario, estas presentan menor proliferación que las NPCs WT. Las NOX son enzimas que consumen altas cantidades de NADPH (Nayernia et al., 2014). Es más, los astrocitos que expresan catalasa en la mitocondria presentan disminuida la razón NADPH/NADP⁺, como consecuencia de la alta actividad de las NOX 1 y NOX2 (Vicente-Gutierrez et al., 2019). En células proliferativas, el ciclo de las pentosas fosfato es necesario para la regulación del estado redox y la síntesis de ácidos nucleicos (Patra and Hay, 2014). Por tanto, el incremento de las NOX en las NPCs mCAT podría provocar la disminución de los niveles de NADPH, lo que reduce la actividad del ciclo de las pentosas fosfato (Ramos-Martinez, 2017), poniendo en riesgo la síntesis de ácidos nucleicos y, por tanto, la proliferación de las NPCs. Esta disminución de los niveles de NADPH podría dar explicación a la reducción de la cantidad de GSH, debido que para su regeneración necesita del cofactor NADPH.

La disminución de los sistemas antioxidantes, como es el glutatión, y el estrés oxidativo severo provocan senescencia (Igelmann et al., 2021; Bakalova et al., 2022), como la observada en las NPCs. Es más, los niveles de NADH y NADPH citosólicos juegan un papel crucial para el destino celular: senescencia o proliferación (Bakalova et al., 2022). Así, la decisión hacia senescencia depende del NADH citoplasmático alto, pero de NADPH bajo, mientras que la proliferación depende de niveles citosólicos altos de NAD⁺ y NADPH que están bajo control mitocondrial. Por tanto, una disminución de los niveles de NADPH,

que ocurre en los astrocitos mCAT (Vicente-Gutierrez et al., 2019) junto con el aumento de la razón GSSG/GSH, podría ser la responsable de la senescencia y, en consecuencia, de la disminución en la proliferación de las NPCs mCAT. Sin embargo, el acortamiento de la longitud de los telómeros en las NPCs embrionarias, en contra de las adultas, no afecta a su capacidad proliferativa, a pesar de la acumulación nuclear de p53 (Ferrón et al., 2004). Por tanto, la menor proliferación de las NPCs mCAT podría estar relacionada con la disponibilidad de NADPH y ácidos nucleicos, más que con el proceso de senescencia.

En conclusión, hemos identificado una nueva vía de regulación de la transición entre proliferación y diferenciación de las NPCs, a través de la modulación de las ROS mitocondriales, que es esencial para el correcto desarrollo de la corteza cerebral. Así, los ROS mitocondriales regulan la producción de ROS extracelulares por las NOX, a través de NRF2, y, con ello, la homeostasis celular y la proliferación de las NPCs embrionarias. Numerosos factores ambientales y mutaciones genéticas pueden alterar la señalización mediada por ROS, lo que puede contribuir a alteraciones del neurodesarrollo, incluso promover tumorigénesis. Por tanto, comprender cómo afectan los ROS mitocondriales a la proliferación y diferenciación de los progenitores neurales, objetivo fundamental de nuestro trabajo, desempeña un papel importante en la identificación de nuevas vías de actuación terapéutica en trastornos del neurodesarrollo y en cáncer.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral podemos concluir.

1. Las ROS mitocondriales regulan la correcta diferenciación de las neuronas en cultivo primario. Así, la reducción endógena de los niveles de ROS mitocondriales acelera el proceso de diferenciación neuronal y, con ello, el envejecimiento prematuro de las neuronas. Es más, las neuronas con bajos niveles endógenos de ROS mitocondriales altera la localización y morfología mitocondriales, lo que podría estar involucrado, al menos parcialmente, en la aceleración del proceso de diferenciación *in vitro*.

2. Los niveles endógenos de mROS tienen una función esencial en la neurogénesis *in vivo*, ya que modulan la proliferación de los progenitores neurales y, con ello, la organización de las capas de la corteza cerebral. Así, la reducción endógena de mROS disminuye la proliferación de los progenitores, acelerando su diferenciación, lo que provoca la desestructuración de la corteza cerebral. Por tanto, las ROS mitocondriales son necesarias para la correcta organización de la corteza cerebral, durante el desarrollo embrionario.

3. Las ROS mitocondriales regulan la producción de ROS extracelulares por las NOX, a través de NRF2, y, con ello, la homeostasis celular y la proliferación de las NPCs embrionarias. Así, la reducción endógena de las ROS provoca estrés oxidativo, al inducir la expresión de las NADPH oxidasas y, por tanto, la producción de ROS extracelulares. Ello altera el equilibrio redox, así como los niveles intracelulares de NADPH y, con ello, la coordinación entre proliferación y la senescencia de los precursores neurales embrionarios.

Conclusión final

En su conjunto los resultados de la presente Tesis doctoral demuestran que las ROS mitocondriales regulan la transición entre proliferación y diferenciación de los progenitores neurales y, con ello, la organización de la corteza cerebral. Es más, la regulación coordinada entre las ROS mitocondriales y los extracelulares, acoplados a través de la vía de señalización de NRF2, regula la homeostasis redox y la decisión entre proliferación y senescencia de los precursores neurales.

Teniendo en cuenta que la coordinación entre proliferación y neurogénesis regula la estructura y tamaño de la corteza cerebral, alteraciones en los niveles de las ROS mitocondriales durante el desarrollo embrionario puede alterar estos procesos, lo que sitúa a las ROS en la etiopatogenia de los trastornos del neurodesarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

Agirman, G., Broix, L., & Nguyen, L. (2017). Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS letters*, 591(24), 3978–3992. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12924>

Almeida, A. & Medina, J. (1998). A rapid method for the isolation of metabolically active mitochondria from rat neurons and astrocytes in primary culture. *Brain Research Protocols*, 2(3), pp.209-214.

Almeida, A., Moncada, S., & Bolaños, J. P. (2004). Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nature cell biology*, 6(1), 45–51. <https://doi.org/10.1038/ncb1080>

Andreyev, A. Yu., Kushnareva, Yu. E., & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 200- 214. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0102-7>

Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy- 2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, e360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>

Azari, H., & Reynolds, B. A. (2016). In Vitro Models for Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(6), a021279. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021279>

Azzam, E. I., Jay-Gerin, J. P., & Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer letters*, 327(1-2), 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012>

[Bakalova, R., Aoki, I., Zhelev, Z., & Higashi, T. \(2022\). Cellular redox imbalance on the crossroad between mitochondrial dysfunction, senescence, and proliferation. *Redox biology*, 53, 102337. https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102337](https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102337)

Balsa, E., Soustek, M. S., Thomas, A., Cogliati, S., García-Poyatos, C., Martín-García, E., Jedrychowski, M., Gygi, S. P., Enriquez, J. A., & Puigserver, P. (2019). ER and Nutrient Stress Promote Assembly of Respiratory Chain Supercomplexes through the PERK-eIF2 α Axis. *Molecular cell*, 74(5), 877–890.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.031>

Barzilai, A. & Yamamoto, K. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair*, 3(8-9), pp.1109-1115.

Bayard, F., & Arnal, J.-F. (2000). Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(5), 388-396. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00336-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00336-1)

Bedard, K. & Krause, K. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1), pp.245-313.

Belarbi, K., Cuvelier, E., Destée, A., Gressier, B., & Chartier-Harlin, M. C. (2017). NADPH oxidases in Parkinson's disease: a systematic review. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0225-5>

Belenguer, G., Domingo-Muelas, A., Ferrón, S. R., Morante-Redolat, J. M., & Fariñas, I. (2016). Isolation, culture and analysis of adult subependymal neural stem cells. *Differentiation; research in biological diversity*, 91(4-5), 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.01.005>

Bigarella, C. L., Liang, R., & Ghaffari, S. (2014). Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development (Cambridge, England)*, 141(22), 4206–4218. <https://doi.org/10.1242/dev.107086>

Bolaños, J. P., Heales S. J., Land J. M., & Clark J. B. (1995) Effect of Peroxynitrite on the Mitochondrial Respiratory Chain: Differential Susceptibility of Neurons and Astrocytes in Primary Culture. *Journal of Neurochemistry* 64 (5): 1965–72.

Bolaños, J. P., Heales S. J., Peuchen S., Barker J. E., Land J. M., & Clark J. B. (1996) Nitric Oxide-Mediated Mitochondrial Damage: A Potential Neuroprotective Role for Glutathione. *Free Radical Biology and Medicine* 21 (7): 995–1001.

Bolaños, J. P., Ciudad, P., García-Nogales, P., Delgado-Esteban, M., Fernández, E., & Almeida, A. (2004). Regulation of glucose metabolism by nitrosative stress in neural cells. *Molecular aspects of medicine*, 25(1-2), 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.009>

Bolaños, J. P., Moro, M. A., Lizasoain, I., & Almeida, A. (2009). Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke:

Therapeutic implications. *Advanced drug delivery reviews*, 61(14), 1299–1315.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.05.009>

Borrás, C., Esteve, J. M., Viña, J. R., Sastre, J., Viña, J., & Pallardó, F. V. (2004). Glutathione regulates telomerase activity in 3T3 fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 279(33), 34332–34335.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M402425200>

Brand, M. D. (2010) The Sites and Topology of Mitochondrial Superoxide Production. *Experimental Gerontology* 45 (7–8).

Brand, M. D. (2020). Riding the tiger - physiological and pathological effects of superoxide and hydrogen peroxide generated in the mitochondrial matrix. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 55(6), 592–661.
<https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1828258>

Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(5), 3289–3303.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>

Buettner G. R. (2011). Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 11(4), 341–346. <https://doi.org/10.2174/187152011795677544>

Burhans, W. C., & Heintz, N. H. (2009). The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free radical biology & medicine*, 47(9), 1282–1293. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.026>

Cadenas, E., & Sies, H. (1998). The lag phase. *Free radical research*, 28(6), 601–609. <https://doi.org/10.3109/10715769809065816>

Cameron, R. S., & Rakic, P. (1991). Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia*, 4(2), 124–137. <https://doi.org/10.1002/glia.440040204>

Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 61(2), 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>

[Cheng, A., Hou, Y., & Mattson, M. P. \(2010\). Mitochondria and neuroplasticity. *ASN neuro*, 2\(5\), e00045. https://doi.org/10.1042/AN20100019](https://doi.org/10.1042/AN20100019)

[Chiu, J., & Dawes, I. W. \(2012\). Redox control of cell proliferation. *Trends in cell biology*, 22\(11\), 592–601. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.08.002](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.08.002)

Chui, A., Zhang, Q., Dai, Q., & Shi, S. H. (2020). Oxidative stress regulates progenitor behavior and cortical neurogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 147(5), dev184150. <https://doi.org/10.1242/dev.184150>

Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology & medicine*, 48(6), 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>

D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10), 813–824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>

Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*, 473(7), 805-825. <https://doi.org/10.1042/BJ20151227>

Dehmelt, L., & Halpain, S. (2004). Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link?. *Journal of neurobiology*, 58(1), 18–33. <https://doi.org/10.1002/neu.1028>

Delgado-Esteban, M., Martin-Zanca, D., Andres-Martin, L., Almeida, A. & Bolaños, J.P. (2007), Inhibition of PTEN by peroxynitrite activates the phosphoinositide-3-kinase/Akt neuroprotective signaling pathway. *Journal of Neurochemistry*, 102: 194-205. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04450.x>

Delgado-Esteban, M., García-Higuera, I., Maestre, C., Moreno, S. and Almeida, A. (2013). APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development. *Nature Communications*, 4(1).

Di Bella, D. J., Habibi, E., Stickels, R. R., Scalia, G., Brown, J., Yadollahpour, P., Yang, S. M., Abbate, C., Biancalani, T., Macosko, E. Z., Chen, F., Regev, A., & Arlotta, P. (2021). Molecular logic of cellular diversification in the mouse cerebral cortex. *Nature*, 595(7868), 554–559. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03670-5>

Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1245049. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>

Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 9829176. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>

Eguren, M., Porlan, E., Manchado, E., García-Higuera, I., Cañamero, M., Fariñas, I., & Malumbres, M. (2013). The APC/C cofactor Cdh1 prevents replicative stress and p53-dependent cell death in neural progenitors. *Nature communications*, 4, 2880. <https://doi.org/10.1038/ncomms3880>

Esteras, N., Dinkova-Kostova, A. & Abramov, A. (2016). Nrf2 activation in the treatment of neurodegenerative diseases: a focus on its role in mitochondrial bioenergetics and function. *Biological Chemistry*, 397(5), 383-400. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0295>

Ferrón, S., Mira, H., Franco, S., Cano-Jaimez, M., Bellmunt, E., Ramírez, C., Fariñas, I., & Blasco, M. A. (2004). Telomere shortening and chromosomal instability abrogates proliferation of adult but not embryonic neural stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 131(16), 4059–4070. <https://doi.org/10.1242/dev.01215>

Ferrón, S. R., Andreu-Agullo, C., Mira, H., Sanchez, P., Marques-Torrejon, M. A., & Farinas, I. (2007). A combined ex/in vivo assay to detect effects of exogenously added factors in neural stem cells. *Nature protocols*, 2(4), 849–859. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.104>

Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: A radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, 201(8), 1203-1209. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.8.1203>

Gal, J. S., Morozov, Y. M., Ayoub, A. E., Chatterjee, M., Rakic, P., & Haydar, T. F. (2006). Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *26*(3), 1045–1056. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4499-05.2006>

Ge, H., Yu, A., Chen, J., Yuan, J., Yin, Y., Duanmu, W., Tan, L., Yang, Y., Lan, C., Chen, W., Feng, H., & Hu, R. (2016). Poly-L-ornithine enhances migration of neural stem/progenitor cells via promoting α -Actinin 4 binding to actin filaments. *Scientific reports*, *6*, 37681. <https://doi.org/10.1038/srep37681>

Hashimoto K. (2018). Essential Role of Keap1-Nrf2 Signaling in Mood Disorders: Overview and Future Perspective. *Frontiers in pharmacology*, *9*, 1182. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01182>

Halliwell, B. (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: A critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British journal of experimental pathology*, *70*(6), 737-757.

Hekimi, S., Lapointe, J. and Wen, Y. (2011). Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology*, *21*(10), pp.569-576.

Herkert, O., Djordjevic, T., BelAiba, R. S., & Görlach, A. (2004). Insights into the redox control of blood coagulation: role of vascular NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the thrombogenic cycle. *Antioxidants & redox signaling*, *6*(4), 765–776. <https://doi.org/10.1089/1523086041361695>

Heroux, N. A., Osborne, B. F., Miller, L. A., Kawan, M., Buban, K. N., Rosen, J. B., & Stanton, M. E. (2018). Differential expression of the immediate early genes

c-Fos, Arc, Egr-1, and Npas4 during long-term memory formation in the context preexposure facilitation effect (CPFE). *Neurobiology of learning and memory*, 147, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.11.016>

Hevner R. F. (2019). Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. *Journal of anatomy*, 235(3), 616–625. <https://doi.org/10.1111/joa.12939>

Holmström, K.M & Finkel, T (2014). Cellular Mechanisms and Physiological Consequences of Redox- Dependent Signalling *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15(6).

Holmgren, A., & Lu, J. (2010). Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(1), 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.083>

Hong, X., Isern, J., Campanario, S., Perdiguero, E., Ramírez-Pardo, I., Segalés, J., Hernansanz-Agustín, P., Curtabbi, A., Deryagin, O., Pollán, A., González-Reyes, J. A., Villalba, J. M., Sandri, M., Serrano, A. L., Enríquez, J. A., & Muñoz-Cánoves, P. (2022). Mitochondrial dynamics maintain muscle stem cell regenerative competence throughout adult life by regulating metabolism and mitophagy. *Cell stem cell*, 29(9), 1298–1314.e10. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.07.009>.

Hung, R. J., Yazdani, U., Yoon, J., Wu, H., Yang, T., Gupta, N., Huang, Z., van Berkel, W. J., & Terman, J. R. (2010). Mical links semaphorins to F-actin disassembly. *Nature*, 463(7282), 823–827. <https://doi.org/10.1038/nature08724>

Igelmann, S., Lessard, F., Uchenunu, O., Bouchard, J., Fernandez-Ruiz, A., Rowell, M. C., Lopes-Paciencia, S., Papadopoli, D., Fouillen, A., Ponce, K. J., Huot, G., Mignacca, L., Benfdil, M., Kalegari, P., Wahba, H. M., Pencik, J., Vuong, N., Quenneville, J., Guillon, J., Bourdeau, V., ... Ferbeyre, G. (2021). A hydride transfer complex reprograms NAD metabolism and bypasses senescence. *Molecular cell*, *81*(18), 3848–3865.e19. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.028>

Iwata, R., Casimir, P., Erkol, E., Boubakar, L., Planque, M., Gallego López, I. M., Ditkowska, M., Gaspariunaite, V., Beckers, S., Remans, D., Vints, K., Vandekeere, A., Poovathingal, S., Bird, M., Vlaeminck, I., Creemers, E., Wierda, K., Corthout, N., Vermeersch, P., Carpentier, S., ... Vanderhaeghen, P. (2023). Mitochondria metabolism sets the species-specific tempo of neuronal development. *Science (New York, N.Y.)*, *379*(6632), eabn4705. <https://doi.org/10.1126/science.abn4705>

Jackson, M. J., Stretton, C., & McArdle, A. (2020). Hydrogen peroxide as a signal for skeletal muscle adaptations to exercise: What do concentrations tell us about potential mechanisms?. *Redox biology*, *35*, 101484. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101484>

Jensen, J. B., & Parmar, M. (2006). Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Molecular neurobiology*, *34*(3), 153–161. <https://doi.org/10.1385/MN:34:3:153>

Kaelin, W. G., Jr, & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*, *30*(4), 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>

Kaludercic, N., & Giorgio, V. (2016). The Dual Function of Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Bioenergetics and Cell Death: The Role of ATP Synthase. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 3869610. <https://doi.org/10.1155/2016/3869610>

Kawabe, H., & Brose, N. (2011). The role of ubiquitylation in nerve cell development. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(5), 251–268. <https://doi.org/10.1038/nrn3009>

Kirova, D. G., Judasova, K., Vorhauser, J., Zerjatke, T., Leung, J. K., Glauche, I., & Mansfeld, J. (2022). A ROS-dependent mechanism promotes CDK2 phosphorylation to drive progression through S phase. *Developmental cell*, 57(14), 1712–1727.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.06.008>

Kornienko, J. S., Smirnova, I. S., Pugovkina, N. A., Ivanova, J. S., Shilina, M. A., Grinchuk, T. M., Shatrova, A. N., Aksenov, N. D., Zenin, V. V., Nikolsky, N. N., & Lyublinskaya, O. G. (2019). High doses of synthetic antioxidants induce premature senescence in cultivated mesenchymal stem cells. *Scientific reports*, 9(1), 1296. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37972-y>

Kovac, S., Angelova, P. R., Holmström, K. M., Zhang, Y., Dinkova-Kostova, A. T., & Abramov, A. Y. (2015). Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochimica et biophysica acta*, 1850(4), 794–801. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.021>

Kristiansen, M., & Ham, J. (2014). Programmed cell death during neuronal development: the sympathetic neuron model. *Cell death and differentiation*, 21(7), 1025–1035. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.47>

Kurz, T., Eaton, J. W., & Brunk, U. T. (2010). Redox activity within the lysosomal compartment: implications for aging and apoptosis. *Antioxidants & redox signaling*, 13(4), 511–523. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.3005>

Lane, N. (2002). *Oxygen: The Molecule that Made the World*. Oxford University Press.

Lykkesfeldt J. (2020). On the effect of vitamin C intake on human health: How to (mis)interpret the clinical evidence. *Redox biology*, 34, 101532. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101532>

Le Belle, J. E., Orozco, N. M., Paucar, A. A., Saxe, J. P., Mottahedeh, J., Pyle, A. D., Wu, H., & Kornblum, H. I. (2011). Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell stem cell*, 8(1), 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.028>

Lee, P., Chandel, N. S., & Simon, M. C. (2020). Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(5), 268–283. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0227-y>

Lee, S. H., Golinska, M., & Griffiths, J. R. (2021). HIF-1-Independent Mechanisms Regulating Metabolic Adaptation in Hypoxic Cancer Cells. *Cells*, 10(9), 2371. <https://doi.org/10.3390/cells10092371>

Li, Nianyu, Kathy Ragheb, Gretchen Lawler, Jennie Sturgis, Bartek Rajwa, J. Andres Melendez, and J. Paul Robinson. (2003). “Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive

Oxygen Species Production.” *The Journal of Biological Chemistry* 278(10):8516–25.

Liu, X., Jiang N., Hughes B., Bigras E., Shoubridge E., and Hekimi S. (2005) Evolutionary Conservation of the Clk-1-Dependent Mechanism of Longevity: Loss of mclk1 Increases Cellular Fitness and Lifespan in Mice. *Genes and Development* 19 (20): 2424–34.

Lopez-Fabuel, I., Le Douce, J., Logan, A., James, A. M., Bonvento, G., Murphy, M. P., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2016). Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(46), 13063–13068.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1613701113>

Lu, S. C. (2013) Glutathione Synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830 (5): 3143–53.

Gaweska, H., & Fitzpatrick, P. F. (2011). Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. *Biomolecular concepts*, 2(5), 365–377.
<https://doi.org/10.1515/BMC.2011.030>

Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox biology*, 6, 260–27
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>

Gomez-Sanchez, J. C., Delgado-Esteban, M., Rodriguez-Hernandez, I., Sobrino, T., Perez de la Ossa, N., Reverte, S., Bolaños, J. P., Gonzalez-Sarmiento, R., Castillo, J., & Almeida, A. (2011). The human Tp53 Arg72Pro polymorphism

explains different functional prognosis in stroke. *The Journal of experimental medicine*, 208(3), 429–437. <https://doi.org/10.1084/jem.20101523>

Mari, M., Morales A., Colell A., García-Ruiz C., and Fernández-Checa J. C. (2009) Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (11): 2685–2700.

Martynoga, B., Drechsel, D., & Guillemot, F. (2012). Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(10), a008359. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008359>

Mesquita, A., Weinberger M., Silva A., Sampaio-Marques B., Almeida B., Leão C., Costa V., Rodrigues F., Burhans W. C., and Ludovico P. (2010) Caloric Restriction or Catalase Inactivation Extends Yeast Chronological Lifespan by Inducing H₂O₂ and Superoxide Dismutase Activity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (34): 15123–28.

Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NFκB system. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 8(3), 227–241. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1331>

Meister, A, and Anderson M. E. (1983) “Glutathione.” *Annual Review of Biochemistry* 52 (1): 711–60.

Moro, M., Almeida, A., Bolanos, J. & Lizasoain, I. (2005). Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(10), pp.1291-1304.

Mori, M. P., Penjweini, R., Ma, J., Alspaugh, G., Andreoni, A., Kim, Y. C., Wang, P. Y., Knutson, J. R., & Hwang, P. M. (2023). Mitochondrial respiration reduces exposure of the nucleus to oxygen. *The Journal of biological chemistry*, 299(3), 103018. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.103018>

Molnár, Z., Clowry, G. J., Šestan, N., Alzu'bi, A., Bakken, T., Hevner, R. F., Hüppi, P. S., Kostović, I., Rakic, P., Anton, E. S., Edwards, D., Garcez, P., Hoerder-Suabedissen, A., & Kriegstein, A. (2019). New insights into the development of the human cerebral cortex. *Journal of anatomy*, 235(3), 432–451. <https://doi.org/10.1111/joa.13055>

Montuschi, P., Barnes, P. J., & Roberts, L. J., 2nd (2004). Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(15), 1791–1800. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2330rev>

Murphy, M. P. (2009) How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. *Biochemical Journal* 417 (1): 1–13.

Murphy, M. P., Holmgren, A., Larsson, N. G., Halliwell, B., Chang, C. J., Kalyanaraman, B., Rhee, S. G., Thornalley, P. J., Partridge, L., Gems, D., Nyström, T., Belousov, V., Schumacker, P. T., & Winterbourn, C. C. (2011). Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell metabolism*, 13(4), 361–366.

Nauseef W. M. (2014). Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(2), 757–767. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.040>

Nathan, C and Cunningham-Bussel, A (2013). Beyond Oxidative Stress: An Immunologist's Guide to Reactive Oxygen Species. *Nature Reviews. Immunology* 13(5):349.

Nathan, C., & Shiloh, M. U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 8841–8848. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8841>

Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(5), pp.469-484.

Nayernia, Z., Jaquet, V., & Krause, K. H. (2014). New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxidants & redox signaling*, 20(17), 2815–2837. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5703>

Nayernia, Z., Colaianna, M., Robledinos-Antón, N., Gutzwiller, E., Sloan-Béna, F., Stathaki, E., Hibaoui, Y., Cuadrado, A., Hescheler, J., Stasia, M. J., Saric, T., Jaquet, V., & Krause, K. H. (2017). Decreased neural precursor cell pool in NADPH oxidase 2-deficiency: From mouse brain to neural differentiation of patient derived iPSC. *Redox biology*, 13, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.026>

Okado-Matsumoto, A., & Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 276(42), 38388–38393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105395200>

Oppenheim R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annual review of neuroscience*, *14*, 453–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.002321>

Oswald, M., Brooks, P., Zwart, M., Mukherjee, A., West, R., Giachello, C., Morarach, K., Baines, R., Sweeney, S. and Landgraf, M. (2018). Reactive oxygen species regulate activity-dependent neuronal plasticity in *Drosophila*. *eLife*, *7*.

Owusu-Ansah, E., & Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, *461*(7263), 537–541. <https://doi.org/10.1038/nature08313>

Ozben T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of pharmaceutical sciences*, *96*(9), 2181–2196. <https://doi.org/10.1002/jps.20874>

Parks, D. A., & Granger, D. N. (1986). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, *548*, 87–99.

Pérez, V. I., Van Remmen H., Bokov A., Epstein C. J., Vijg J., and Richardson A. (2009) The Overexpression of Major Antioxidant Enzymes Does Not Extend the Lifespan of Mice. *Aging Cell* *8* (1): 73–75.

Quintana-Cabrera, R., Fernandez-Fernandez, S., Bobo-Jimenez, V., Escobar, J., Sastre, J., Almeida, A. and Bolaños, J. (2012). γ -Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. *Nature Communications*, *3*(1).

Rahman, M., Ford, C. E., Cutler, J. A., Davis, B. R., Piller, L. B., Whelton, P. K., Wright, J. T., Jr, Barzilay, J. I., Brown, C. D., Colon, P. J., Sr, Fine, L. J., Grimm, R. H., Jr, Gupta, A. K., Baimbridge, C., Haywood, L. J., Henriquez, M. A., Ilamaythi, E., Oparil, S., Preston, R., & ALLHAT Collaborative Research Group (2012). Long-term renal and cardiovascular outcomes in Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT) participants by baseline estimated GFR. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 7(6), 989–1002. <https://doi.org/10.2215/CJN.07800811>

Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>

Rampon, C., Volovitch, M., Joliot, A., & Vriza, S. (2018). Hydrogen Peroxide and Redox Regulation of Developments. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(11), 159. <https://doi.org/10.3390/antiox7110159>

Ramos-Martinez J. I. (2017). The regulation of the pentose phosphate pathway: Remember Krebs. *Archives of biochemistry and biophysics*, 614, 50–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.12.012>

Rowe, L. A., Degtyareva, N., & Doetsch, P. W. (2008). DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free radical biology & medicine*, 45(8), 1167–1177. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.018>

Rhee S. G. (2016). Overview on Peroxiredoxin. *Molecules and cells*, 39(1), 1–5. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2368>

Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5052), 1707–1710. <https://doi.org/10.1126/science.1553558>

Rodríguez, C., Ramos-Araque, M. E., Domínguez-Martínez, M., Sobrino, T., Sánchez-Morán, I., Agulla, J., Delgado-Esteban, M., Gómez-Sánchez, J. C., Bolaños, J. P., Castillo, J., & Almeida, A. (2018). Single-Nucleotide Polymorphism 309T>G in the MDM2 Promoter Determines Functional Outcome After Stroke. *Stroke*, 49(10), 2437–2444. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.022529>

Sánchez-Morán, I., Rodríguez, C., Lapresa, R., Agulla, J., Sobrino, T., Castillo, J., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2020). Nuclear WRAP53 promotes neuronal survival and functional recovery after stroke. *Science advances*, 6(41), eabc5702. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc5702>

Sandberg, M., Patil, J., D'Angelo, B., Weber, S. G., & Mallard, C. (2014). NRF2-regulation in brain health and disease: implication of cerebral inflammation. *Neuropharmacology*, 79, 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.11.004>

Saud Alothman, Norah. Función neuroprotectora de la terapia antioxidante dirigida a la mitocondria en la isquemia cerebral (2019)(Tesis Doctoral)

Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>

Semenza G. L. (2004). Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* (Bethesda, Md.), 19, 176–182. <https://doi.org/10.1152/physiol.00001.2004>

Semenza G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>

Siena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, 48(2), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>

Sies, H. (2019). Chapter 13 - Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. En G. Fink (Ed.), *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (pp. 153-163). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8>

Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

Sies, H., & Menck, C. F. M. (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research/DNAging*, 275(3), 367-375. [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(92\)90039-R](https://doi.org/10.1016/0921-8734(92)90039-R)

Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>

Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochemistry and cell biology*, 122(4), 383–393. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0673-1>

Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Murphy, M. P., Yamamoto, M., & Winterbourn, C. (2022). Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 23(7), 499–515. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>

Schaar, C. E., Dues D. J., Spielbauer K. K., Machiela E., Cooper J. F., Senchuk M., Hekimi S., & Van Raamsdonk J. M. (2015) Mitochondrial and Cytoplasmic ROS Have Opposing Effects on Lifespan. *PLoS Genetics* 11 (2):e1004972.

Sciskalska, M., Zalewska, M., Grzelak, A., & Milnerowicz, H. (2014). The influence of the occupational exposure to heavy metals and tobacco smoke on the selected oxidative stress markers in smelters. *Biological trace element research*, 159(1-3), 59–68. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9984-9>

Spiteller G. (2007). The important role of lipid peroxidation processes in aging and age dependent diseases. *Molecular biotechnology*, 37(1), 5–12. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0057-6>

Stadtman E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5074), 1220–1224. <https://doi.org/10.1126/science.1355616>

Sun, T., & Hevner, R. F. (2014). Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nature reviews. Neuroscience*, 15(4), 217–232. <https://doi.org/10.1038/nrn3707>

Szanto I. (2022). NADPH Oxidase 4 (NOX4) in Cancer: Linking Redox Signals to Oncogenic Metabolic Adaptation. *International journal of molecular sciences*, 23(5), 2702. <https://doi.org/10.3390/ijms23052702>

Tamarit, J., Cabiscol, E., & Ros, J. (1998). Identification of the major oxidatively damaged proteins in Escherichia coli cells exposed to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 273(5), 3027–3032. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.5.3027>

Taguchi, K., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 16(2), 123–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>

Taverne, Y. J., Merkus, D., Bogers, A. J., Halliwell, B., Duncker, D. J., & Lyons, T. W. (2018). Reactive Oxygen Species: Radical Factors in the Evolution of Animal Life. *BioEssays*, 40(3), 1700158. <https://doi.org/10.1002/bies.201700158>

Terzi, A., & Suter, D. M. (2020). The role of NADPH oxidases in neuronal development. *Free radical biology & medicine*, 154, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04>

Tormos, K. V., Anso, E., Hamanaka, R. B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., & Chandel, N. S. (2011). Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell metabolism*, 14(4), 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.007>

Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., Yongvanit, P., Kawanishi, S., & Murata, M. (2014). Oxidative stress and its significant roles

in neurodegenerative diseases and cancer. *International journal of molecular sciences*, 16(1), 193–217. <https://doi.org/10.3390/ijms16010193>

Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free radical biology & medicine*, 43(1), 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024>

Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, 27, 502-522. doi:10.1016/0003-2697(69)90064-5

Turkan I. (2018). *ROS and RNS: key signalling molecules in plants*. *Journal of experimental botany*, 69(14), 3313–3315. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery198>

Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E., & Shirihai, O. S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal*, 27(2), 433–446.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1), 37-56. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89>

Vargas, M. R., and Johnson J. A. (2009) The Nrf2-ARE Cytoprotective Pathway in Astrocytes.”*Expert Rev Mol Med* 11 (June): e17.

Vermot, A.; Petit-Härtlein, I.; Smith, S.M.E.; Fieschi, F (2021). NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants*, *10*, 890. <https://doi.org/10.3390/antiox10060890>

Vicente-Gutierrez, C., Bonora, N., Bobo-Jimenez, V., Jimenez-Blasco, D., Lopez-Fabuel, I., Fernandez, E., Josephine, C., Bonvento, G., Enriquez, J. A., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2019). Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour. *Nature metabolism*, *1*(2), 201–211. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0031>

Vicente-Gutierrez, C., Bonora, N., Jimenez-Blasco, D., Lopez-Fabuel, I., Bates, G., Murphy, M. P., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2021). Abrogating mitochondrial ROS in neurons or astrocytes reveals cell-specific impact on mouse behaviour. *Redox biology*, *41*, 101917. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101917>

Villalba, A., Götz, M., & Borrell, V. (2021). The regulation of cortical neurogenesis. *Current topics in developmental biology*, *142*, 1–66. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2020.10.003>

Viña, J., Borras, C., Abdelaziz, K. M., Garcia-Valles, R., & Gomez-Cabrera, M. C. (2013). The Free Radical Theory of Aging Revisited: The Cell Signaling Disruption Theory of Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, *19*(8), 779-787. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5111>

Walker, C.L.Pomatto, L.C.D.,Tripathi, D. N. & Davies, K. J. A (2018). Redox regulation of homeostasis and proteostasis in peroxisomes. *Physiol. Rev.* *98*

West, H., McCleod, M., Hussein, M., Morabito, A., Rittmeyer, A., Conter, H. J., Kopp, H. G., Daniel, D., McCune, S., Mekhail, T., Zer, A., Reinmuth, N., Sadiq, A., Sandler, A., Lin, W., Ochi Lohmann, T., Archer, V., Wang, L., Kowanetz, M., & Cappuzzo, F. (2019). Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, *20*(7), 924–937. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30167-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30167-6)

Winterbourn C. C. (2020). *Hydrogen peroxide reactivity and specificity in thiol-based cell signalling*. *Biochemical Society transactions*, *48*(3), 745–754. <https://doi.org/10.1042/BST20190049>

Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition*, *134*(3), 489–492. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>

Wilson, C., & González-Billault, C. (2015). Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: implications for neuronal development and trafficking. *Frontiers in cellular neuroscience*, *9*, 381. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00381>

Wilson, C., Muñoz-Palma, E., & González-Billault, C. (2018). From birth to death: A role for reactive oxygen species in neuronal development. *Seminars in cell & developmental biology*, *80*, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2017.09.012>

Weichhart T. (2018). mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology*, 64(2), 127–134.

<https://doi.org/10.1159/000484629>

Wang, X., and Hai C. (2016) Novel Insights into Redox System and the Mechanism of Redox Regulation. *Molecular Biology Reports* 43 (7): 607–28.

Yamamoto, M., Kensler, T. W., & Motohashi, H. (2018). The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiological reviews*, 98(3), 1169–1203.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2017>

Yan, Y., Wladyka, C., Fujii, J., & Sockanathan, S. (2015). Prdx4 is a compartment-specific H₂O₂ sensor that regulates neurogenesis by controlling surface expression of GDE2. *Nature communications*, 6, 7006.

<https://doi.org/10.1038/ncomms8006>

Yu, W., Tu, Y., Long, Z., Liu, J., Kong, D., Peng, J., Wu, H., Zheng, G., Zhao, J., Chen, Y., Liu, R., Li, W., & Hai, C. (2022). Reactive Oxygen Species Bridge the Gap between Chronic Inflammation and Tumor Development. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022, 2606928.

<https://doi.org/10.1155/2022/2606928>

Yoboue, E. D., Sitia, R., & Simmen, T. (2018). Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages. *Cell death & disease*, 9(3), 331. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0033-4>

<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0033-4>

Zámocký, M. & Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72(1), pp.19-66.

Zamocky, M., Furtmüller, P. & Obinger, C. (2008). Evolution of Catalases from Bacteria to Humans. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), pp.1527-1548.

Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 4350965. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>