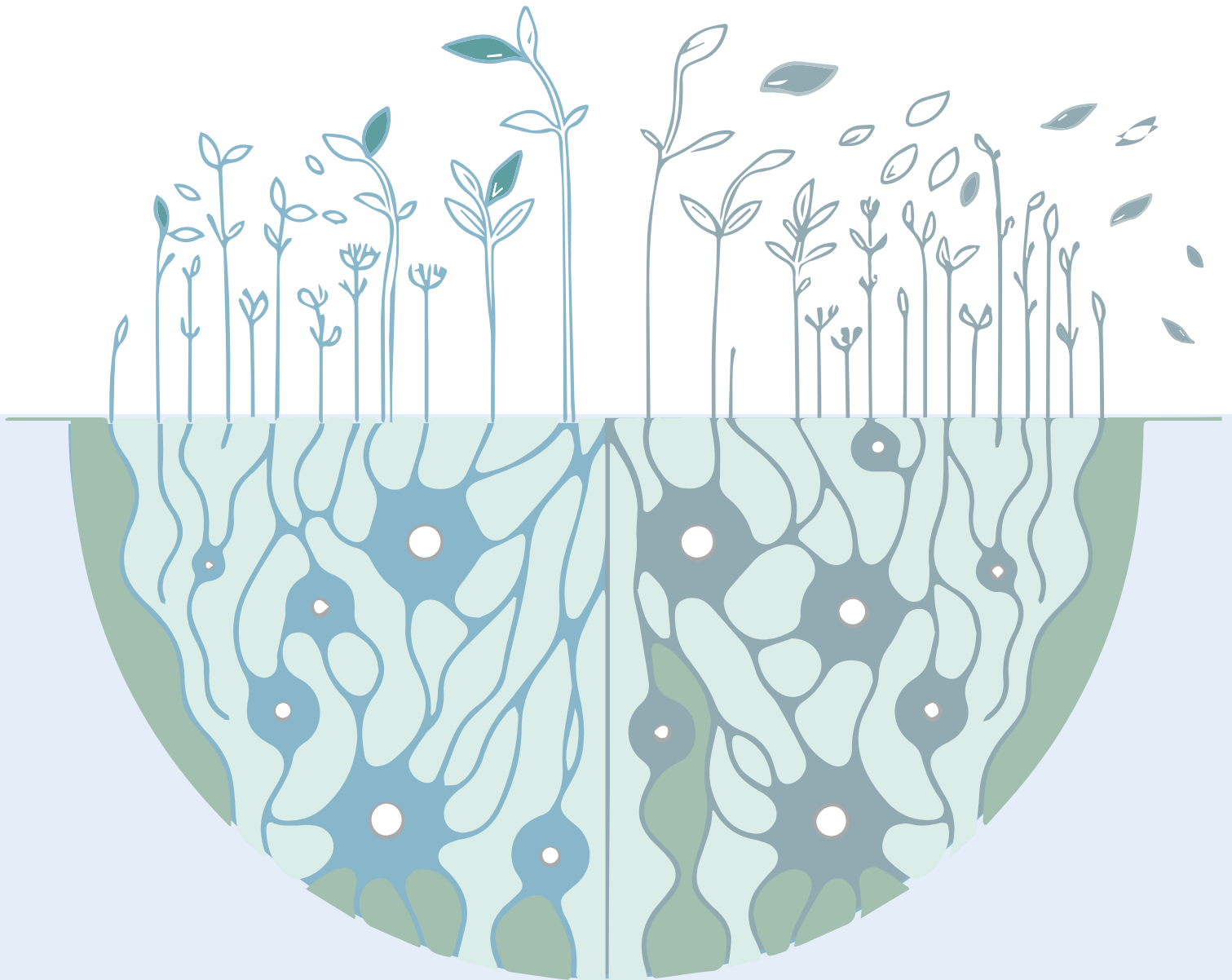

Alteraciones metabólicas y comportamentales por la eliminación de la enzima proglucolítica PFKFB3 de astrocitos en ratón

Tesis Doctoral



Paula Alonso Batán

NOVIEMBRE DE 2023



Alteraciones metabólicas y comportamentales
por la eliminación de la enzima proglucolítica
PFKFB3 de astrocitos en ratón

TESIS DOCTORAL

Paula Alonso Batán

DIRECCIÓN

Dr. Juan Pedro Bolaños Hernández

Dr. Daniel Jiménez-Blasco

Noviembre 2023

Universidad de Salamanca

INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA

Juan Pedro Bolaños Hernández, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca y el Dr. Daniel Jiménez Blasco, investigador postdoctoral del CIBERFES.

La presentación de la tesis doctoral titulada *Alteraciones metabólicas y comportamentales por la eliminación de la enzima proglucolítica PFKFB3 de astrocitos en ratón* ha sido realizada bajo su dirección por la Graduada en Biología (Universidad de Santiago de Compostela), **Paula Alonso Batán**, en el centro mixto Universidad de Salamanca-CSIC Instituto de Biología Funcional y Genómica.

Y para que así conste, firman la presente certificación en Salamanca, a 9 de noviembre de 2023.

Fdo. Juan Pedro Bolaños Hernández

Fdo. Daniel Jiménez Blasco



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



**INSTITUTO
DE BIOLOGÍA FUNCIONAL
Y GENÓMICA**



Este trabajo está financiado por los fondos europeos Next Generation EU/PRTR y de la Agencia Estatal de Investigación (10.13039/501100011033; PID2019-105699RB-I00; PDC2021-121013-I00; RED2018-102576-T); del Instituto de Salud Carlos III (CB16/10/00282) y de la Junta de Castilla y León (CS/151P20 y Escalera de Excelencia CLU-2017-03).

Paula Alonso Batán obtuvo un contrato predoctoral de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (FPU18/02174).

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar con una parte importante de este trabajo de tesis doctoral, puesto que, como todos sabemos, el trabajo de laboratorio es imprescindiblemente colaborativo y creo que es necesario que al menos quede un reflejo de ello por escrito. No seré muy breve.

En primer lugar, dar las gracias a Juan Pedro, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por dejar que nos equivoquemos y pensemos por nosotros mismos.

A mi director y compañero de discusiones, Dani, porque realmente has hecho que este trabajo sea mejor, y por ser un pilar básico del laboratorio. Creo, bueno, sé que eres la persona con la que más he discutido del laboratorio, también de ciencia, pero siempre con respeto y cariño.

A Brenda, con la que empecé y siento que he terminado, aunque ya no forme parte de este laboratorio. Gracias por ser la primera que me recibió para hacerme sentir más cómoda, y por estar siempre dispuesta a ayudar, por ser mi Zape. A Sara, por tus maravillosas fotos y enorme ayuda con su análisis, pero sobre todo por tu cariño, por estar siempre preocupándote y dispuesta a echar un cable tanto en lo personal como en lo profesional. A Luisa, por tu pensamiento crítico, a pesar de la locura que está intrincada debajo de esa mente lógica, gracias por tu apoyo y alegría. A Darío, por tu ayuda metabólica y estrambólica, tus aportes científicos y, por supuesto, gracias por reírte de mis chistes. A Isra, por tu buen humor y tranquilidad para lidiar con las dificultades y por ese chocolate que tantas veces nos ofreces. A Marina, por tu buen humor y esfuerzo, por hacernos sentir como flores dentro del laboratorio.

A Moni, por tu paciencia, porque siempre tratas de preocuparte por nosotros, aunque a veces te saquemos de quicio. A Lucia y Estefanía, por vuestra gentileza, disposición y ese control de los animales que tanto nos facilita la vida. A Virginia, por tu atención y tu amabilidad. A Emilio Fernández por tu maestría bioquímica y por ese humor tuyo que tanto te caracteriza. A Carlitos, por tu sabiduría, tu sosiego y tu amistad. A Rubén, gracias porque siempre tenías algo bueno que aportar, y no hablo de los chistes. A Irene, por tu capacidad de observación y por ser la primera que me aconsejó bajar el ritmo, ¡ahora estoy de acuerdo contigo!

A Evita, por tu gran dedicación, compañerismo y dulzura. Espero y estoy segura de que te irá de maravilla en la ciencia. A João, por tu pulcritud a la hora de realizar los experimentos, que siempre tratabas de contagiar, y por tu bondad y dedicación a los demás. Gracias también a todos los que habéis pasado por el laboratorio y habéis dejado un granito de arena en él: Alberto, Pierre, Elda. Je tiens également à remercier mes collègues de Poitiers pour votre aide scientifique et personnelle, en particulier Amin, Perrine et Maryne.

Por supuesto, no puedo ni quiero olvidarme de mis compañeros del 2.9, empezando por Ángeles, por su dedicación y por sus aportaciones científicas. A María, porque estás siempre en la sombra poniendo un poco de orden y dando ánimos al mismo tiempo.

Gracias a Soni, por dejar de saludar como un kiwi, por estar pendiente y preocuparte... ¡y por tu limpieza! A Regi, por tu apoyo, tu cariño y tu sentido del humor. A Leti, otra sufriendora de la PFKFB3, gracias por ofrecerme siempre tu ayuda y por tu honestidad. A Sandra, por las conversaciones existenciales a hora y a deshora. A Silvi, por ser tan organizada y dispuesta, y por acompañarme por las calles de Berlín para comernos un rico y seco pretzel.

A Chustín y a Rebeca por vuestra ayuda con los animales; por ser nuestro informático/técnico/electricista personal y por hacerme sentir guapa con el pelo recogido, respectivamente. A Cris, por tu calma, y por tratar siempre de aportar. A Vero, por esos veloces montajes de cerebros flotantes, acompañados por unas buenas risas. A Sire, por tu amabilidad y disposición, eres de esas personas cuya ausencia se hace notar en el laboratorio. A Hermosín, por tu sencillez y alegría, y porque siempre saludabas.

Gracias a mis compañeros peludos por su importante papel en la ciencia. A veces trabajar bien con ellos no es tan fácil como parecía sobre el papel, pero debemos seguir colaborando para avanzar hacia prácticas científicas más éticas.

Gracias también a todo el personal del IBFG que hace que las cosas funcionen mejor. Gracias Julio por tus gestiones y por tus deliciosos quiches.

Gracias a mis amigxs, particularmente a Bea y Laura por escuchar mis quejas y sufrir mis retrasos.

Gracias a mi familia, en especial a mis padres por su apoyo incondicional, y por entenderme y perdonarme por encima de todo. Gracias a mi primo David, porque siempre encuentra un momento para acordarse de mí. A mi hermano, que tanto ha tenido que aguantarme desde que soy pequeñita como una pelota. Gracias a Fer, por TODO. Por hacerme ver las cosas desde la calma y la lógica, por apoyarme.

A Alelí, el único ser importante en mi vida que sé que no será capaz de entender nada de lo que acabo de escribir. Aunque bueno, todo es posible, a menos que no lo sea.

ÍNDICE

Introducción.....	11
1. Contexto y relevancia de la glucólisis.....	13
<i>Importancia de la glucólisis.....</i>	<i>13</i>
<i>Definición de la ruta glucolítica.....</i>	<i>15</i>
<i>Etapas de la ruta glucolítica.....</i>	<i>16</i>
2. Regulación de la glucólisis y PFKFB3.....	19
<i>Control de la ruta glucolítica.....</i>	<i>19</i>
<i>Descubrimiento y variantes de la PFK2 (o PFKFB).....</i>	<i>25</i>
<i>Regulación de la PFK2.....</i>	<i>28</i>
<i>Utilización diferencial de la glucosa entre astrocitos y neuronas.....</i>	<i>31</i>
<i>Modulación espaciotemporal de la glucólisis.....</i>	<i>32</i>
3. Integración del metabolismo en el Sistema Nervioso.....	35
<i>Acoplamiento del metabolismo glucídico entre astrocitos y neuronas.....</i>	<i>36</i>
<i>Acoplamiento del metabolismo oxidativo diferencial entre astrocitos y neuronas.....</i>	<i>46</i>
<i>Acoplamiento del metabolismo lipídico entre astrocitos y neuronas.....</i>	<i>52</i>
<i>Otros componentes de la interacción astrocito-neurona.....</i>	<i>53</i>
4. Heterogeneidad astrocítica en el cerebro.....	55
<i>Tipos de astrocitos.....</i>	<i>56</i>
<i>Marcadores específicos de astrocitos.....</i>	<i>56</i>
Hipótesis y Objetivos.....	59
Materiales y Métodos.....	63
1. Trabajo con modelos de ratón modificados genéticamente.....	65
1.1. <i>Generación del modelo de ratón KO condicional PFKFB3.....</i>	<i>65</i>
2. Genotipado de ratones.....	66
2.1. <i>Extracción de ADN genómico.....</i>	<i>67</i>
2.2. <i>Identificación genotípica de los ratones Pfkfb3^{Lox/Lox} y de la recombinación.....</i>	<i>67</i>
2.3. <i>Identificación de la ausencia del casete de neomicina y flipasa.....</i>	<i>68</i>
3. Medios y soluciones.....	68
4. Cultivos celulares.....	72
4.1. <i>Cultivo primario de astrocitos corticales del modelo Pfkfb3^{lox/lox} murino.....</i>	<i>72</i>
4.2. <i>Transducción de cultivo primario de astrocitos con adenovirus.....</i>	<i>73</i>
5. Tratamientos específicos de los cultivos celulares.....	74
5.1. <i>Tratamiento con cianuro potásico (KCN).....</i>	<i>74</i>
5.2. <i>Tratamiento con 1,4-dideoxi-1,4-imino-d-arabinitol (DAB).....</i>	<i>74</i>
5.3. <i>Tratamiento con inhibidores de lisosomas (IL).....</i>	<i>74</i>

6.	Generación de ratones PFKFB3 KO	75
6.1.	<i>Inyección retroorbital</i>	75
7.	Obtención de células astrocíticas y neuronales de ratón adulto	76
7.1.	<i>Disgregación de tejido cerebral adulto</i>	76
7.2.	<i>Aislamiento y separación celular mediante métodos inmunomagnéticos</i>	77
8.	Preparación, extracción y normalización de muestras	78
8.1.	<i>Extracción y cuantificación de proteínas</i>	78
8.2.	<i>Extracción y solubilización de mitocondrias</i>	79
8.3.	<i>Cuantificación de núcleos con tinción DAPI</i>	80
9.	Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas	81
9.1.	<i>Electroforesis desnaturalizante</i>	81
9.2.	<i>Electroforesis en condiciones nativas</i>	81
9.3.	<i>Transferencia tipo Western blot e inmunodetección de proteínas</i>	82
9.4.	<i>Análisis y cuantificación de imágenes</i>	83
10.	Determinación de flujos metabólicos con radioisótopos	83
11.	Estudio del metabolismo de glucosa	86
11.1.	<i>Determinación de la glucólisis a partir de D-[3-³H]-glucosa</i>	86
11.2.	<i>Determinación de la PPP a partir de D-[1-¹⁴C]-glucosa y D-[6-¹⁴C]-glucosa</i>	86
11.3.	<i>Determinación de los niveles de F26BP</i>	87
11.4.	<i>Medida de glucosa y lactato extracelulares</i>	88
11.5.	<i>Determinación de la captación de deoxi-D-glucosa, 2-[1,2-³H(N)]</i>	89
11.6.	<i>Determinación de los niveles de glucógeno</i>	90
12.	Análisis del metabolismo de ácidos grasos	92
12.1.	<i>Determinación de la descarboxilación del [1-¹⁴C]-palmitato y formación de cuerpos cetónicos</i>	92
12.2.	<i>Determinación de la β-oxidación a partir de [9,10-³H]-palmitato</i>	93
13.	Análisis del metabolismo de piruvato	94
13.1.	<i>Determinación de la descarboxilación del [1-¹⁴C]-piruvato</i>	94
13.2.	<i>Determinación de la descarboxilación del [2-¹⁴C]-piruvato</i>	95
14.	Determinación de la tasa de consumo de oxígeno	95
15.	Análisis del estado REDOX celular	99
15.1.	<i>Detección de peróxido de hidrógeno mediante Amplex® Red</i>	99
15.2.	<i>Detección de ROS mitocondriales mediante MitoSox™</i>	101
15.3.	<i>Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante MitoProbe™ DiIC₁</i>	102
15.4.	<i>Determinación de niveles de NAD⁺ y NADH intracelulares</i>	103
16.	Análisis del estado energético celular	104
16.1.	<i>Determinación de los niveles de ATP intracelulares</i>	104
16.2.	<i>Tasas de producción de ATP glucolítico y mitocondrial mediante Seahorse</i>	104
17.	Análisis del comportamiento espontáneo del ratón	106

17.1.	<i>Evaluación de la exploración mediante la prueba de campo abierto (Openfield).....</i>	106
17.2.	<i>Evaluación de la memoria mediante el reconocimiento de nuevos objetos.....</i>	107
17.3.	<i>Evaluación de la memoria espacial mediante el laberinto de Barnes.....</i>	108
17.4.	<i>Evaluación de memoria de trabajo mediante el laberinto en Y (Y-maze).....</i>	109
17.5.	<i>Evaluación de la exploración en la caja de agujeros (Hole board).....</i>	110
17.6.	<i>Evaluación de los niveles de miedo/ansiedad en la caja Blanca/Negra.....</i>	110
17.7.	<i>Evaluación de la coordinación motora mediante la prueba de Rotarod.....</i>	111
18.	Perfusión de los animales y análisis inmunohistoquímico	112
18.1.	<i>Perfusión de los animales, fijación y crioprotección del tejido cerebral.....</i>	112
18.2.	<i>Obtención de secciones cerebrales e inmunohistoquímica</i>	113
18.3.	<i>Adquisición y análisis de imágenes.....</i>	114
19.	Análisis metabólico en muestras de cerebro de ratón adulto	115
20.	Análisis estadístico	117
Resultados		119
I.	Comprobación del modelo <i>knockout</i> condicional de PFKFB3 en cultivo primario de astrocitos	121
	<i>Desarrollo de una estrategia para el estudio de la relevancia de la PFKFB3 en cultivo primario de astrocitos .</i>	121
	<i>La eliminación de PFKFB3 en cultivo primario de astrocitos provoca una disminución de los niveles de F26BP intracelulares.....</i>	123
	<i>La ausencia de PFKFB3 no conlleva al aumento de los niveles proteicos de las otras isoformas de la PFK2.....</i>	123
	<i>La eliminación de PFKFB3 en cultivo primario de astrocitos provoca una disminución del flujo glucolítico.....</i>	124
	<i>El aumento de la glucólisis por KCN no se debe a un aumento de los niveles de F26BP</i>	125
II.	Evaluación de los cambios metabólicos por la eliminación de PFKFB3 en cultivo primario de astrocitos.....	126
	<i>Los astrocitos carentes de PFKFB3 no redirigen más glucosa hacia la PPP.....</i>	126
	<i>Los astrocitos PFKFB3 KO presentan alteraciones en el uso del glucógeno.....</i>	127
	<i>Las reservas de glucógeno diferenciales en los astrocitos PFKFB3 KO no afectan a su capacidad glucolítica....</i>	131
	<i>La capacidad de captación de la glucosa se reduce por la ausencia de PFKFB3 en astrocitos.....</i>	133
	<i>La delección de PFKFB3 en los astrocitos conduce a una disminución de la producción de lactato extracelular .</i>	134
	<i>La eliminación de PFKFB3 en los astrocitos provoca un aumento de la entrada de piruvato en la mitocondria</i>	134
	<i>Los astrocitos carentes de PFKFB3 no compensan su escasa capacidad glucolítica con una mayor tasa de oxidación de ácidos grasos.....</i>	137
	<i>La descarboxilación mitocondrial del acetil-CoA producido a partir de ácidos grasos es mayor en los astrocitos carentes de PFKFB3</i>	138
	<i>La activación del TCA no se debe a un disminución del NADH</i>	139
	<i>La remodelación mitocondrial en ausencia de PFKFB3 conduce a un aumento de la respiración mitocondrial.</i>	140
	<i>La remodelación metabólica mitocondrial inducida por la ausencia de PFKFB3 en los astrocitos afecta a la función energética de la CTE y a la fosforilación oxidativa</i>	141
	<i>La eliminación de la PFKFB3 en astrocitos conduce a una reestructuración de la cadena de transporte mitocondrial</i>	143

<i>Los astrocitos PFKFB3 KO presentan menores tasas de producción de H₂O₂.....</i>	<i>143</i>
III. Comprobación del modelo <i>knockout</i> condicional de PFKFB3 en ratón adulto	145
<i>Delección genética de PFKFB3 en astrocitos de ratón adulto joven y maduro.....</i>	<i>145</i>
<i>Comprobación de la delección genética de PFKFB3 en astrocitos de ratón</i>	<i>145</i>
<i>El cerebro de los ratones PFKFB3 KO es menos glucolítico</i>	<i>146</i>
IV. Consecuencias funcionales de la eliminación de PFKFB3 en astrocitos de cerebro de ratón	147
<i>Los animales PFKFB3 KO presentan déficits de memoria</i>	<i>147</i>
<i>Los animales con la delección genética de PFKFB3 presentan alteraciones en la conducta</i>	<i>150</i>
V. Progresión de las consecuencias funcionales de la eliminación de PFKFB3 en astrocitos de cerebro de ratón joven	155
<i>La eliminación de PFKFB3 en astrocitos empeora el fenotipo exploratorio, pero no el de miedo/ansiedad a largo plazo.....</i>	<i>155</i>
VI. Cambios permanentes metabólicos y estructurales por la eliminación de PFKFB3 en astrocitos de cerebro de ratón adulto	158
<i>La eliminación de la PFKFB3 en astrocitos influye en el metabolismo cerebral.....</i>	<i>158</i>
VII. La eliminación de la PFKFB3 en astrocitos altera la morfología de las células neurales	167
VIII. La eliminación de PFKFB3 en astrocitos tiene un efecto diferencial en el comportamiento de ratones hembra jóvenes en comparación con machos.....	173
Discusión	177
Conclusiones	197
Bibliografía.....	201

Abreviaturas

A continuación, se presentan las abreviaturas y siglas relevantes utilizadas en este trabajo. No se incluyen las correspondientes a medios y soluciones, detalladas en el apartado 3 de *Materiales y Métodos*. Se excluyen también aquellas usadas solo una vez.

2DG	2-deoxi-D-glucose
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Aldh1L1	Aldehído deshidrogenasa 1
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ANLS	Lanzadera de lactato astrocito-neurona
APC/C	Complejo promotor de anafase/Ciclosoma
ARN(m)	Ácido ribonucleico (mensajero)
ATP	Adenosín trifosfato
CCCP	cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona
CTE	Cadena de Transporte de Electrones
DHAP	Dihidroxiacetona 3-fosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F16BP	Fructosa 1,6-bisfosfato
F6P	Fructosa 6-fosfato
FADH2	Flavina adenina dinucleótido reducido
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FRT	Secuencia de reconocimiento de flipasa
G6P	Glucosa 6-fosfato
GA3P	Gliceraldehído 3-fosfato
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GLUT	Transportadores de glucosa
GSH/GSSG	Glutación reducido/oxidado

GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
HIF1	Factor inducible por hipoxia
KO	<i>Knockout</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
MCT	Transportadores de Monocarboxilatos
MMI/E	Membrana mitocondrial interna/externa
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) reducida
NDRG2	<i>N-myc Downstream-Regulated Gene 2</i>
Nfr2	<i>Nuclear factor erythroid-derived 2 - like 2</i>
NMDA	N-metil-D-aspartico
O.N	<i>Overnight</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFK1	Fosfofructoquinasa-1
PFKFB/PFK2	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa
PK	Piruvato quinasa (Isoformas: PKM1 y PKM2)
PKC	Proteína quinasa C
PKB/Akt	Proteína quinasa B
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
PPP	Ruta de las pentosas fosfato
ref.	Referencia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SC	Supercomplejo
SDS	Dodecilsulfato sódico
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
TIGAR	<i>TP53 inducible glycolysis and apoptosis regulator</i>
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

Resumen

El acoplamiento metabólico entre astrocitos y neuronas es fundamental para el funcionamiento cerebral y las funciones neurales superiores, un contexto en el que la ruta glucolítica parece esencial. Los astrocitos, a diferencia de las neuronas, metabolizan la glucosa principalmente a través de la glucólisis, probablemente debido a los altos niveles de PFKFB3, una enzima proglucolítica. En esta Tesis Doctoral se describe el impacto de la PFKFB3 astrocítica en el mantenimiento de la función neuronal, conducta y rendimiento cognitivo. Para ello, hemos desarrollado un modelo experimental que elimina genética y selectivamente PFKFB3 en astrocitos de ratón adulto. Hemos evaluado el papel fisiológico de la PFKFB3 y, por ende, de la glucólisis, en el metabolismo astrocitario y su influencia en el metabolismo general, la funcionalidad neuronal y el comportamiento en ratones adultos, tanto jóvenes como maduros. Los resultados indican que la ausencia de PFKFB3 en astrocitos conlleva a una alteración del uso normal de la glucosa y una remodelación del metabolismo mitocondrial y de la organización de los complejos de la cadena transportadora de electrones, acompañado de una reducción de la formación fisiológica de especies reactivas de oxígeno. Estos cambios se traducen en un desequilibrio del estado redox, de los procesos anapleróticos y de la neurotransmisión, los cuales pueden subyacer a las alteraciones observadas en la capacidad cognitiva y conducta. Además, se demuestra la importancia de la PFKFB3 astrocitaria en las etapas más tempranas de la edad adulta y su influencia según el sexo.

Creemos que estos hallazgos aportan una valiosa información sobre la intrincada relación entre metabolismo y función cerebral, y sugieren posibles nuevas dianas moleculares responsables del declive cognitivo durante el envejecimiento.

INTRODUCCIÓN

1. Contexto y relevancia de la glucolisis

Importancia de la glucolisis

La glucosa desempeña un papel fundamental en la intrincada red metabólica de los diferentes sistemas. Algunos tejidos tienen también la capacidad de utilizar lípidos y proteínas. Sin embargo, en el contexto de la bioenergética, la glucosa sigue destacando como la molécula predominante, particularmente en el cerebro, donde se convierte en la principal fuente de energía en condiciones normales. Además de la glucosa, el sistema nervioso también puede utilizar otros sustratos, como los ácidos grasos o los cuerpos cetónicos, que adquieren gran relevancia en situaciones de inanición o privación de glucosa (Owen, 2005).

Una vez entra en la célula, la glucosa se puede oxidar por la vía glucolítica, en la cual se convierte en dos moléculas de piruvato. Se trata de una ruta citosólica común prácticamente a todas las células, tanto procariotas como eucariotas. En comparación con la glucolisis, la fosforilación oxidativa es un proceso mucho más eficiente para la producción de adenosín trifosfato (ATP). No obstante, la ruta glucolítica adquiere una importancia crítica en determinadas células o escenarios, a pesar de su menor producción energética. Es el caso de las células cancerosas, en las que se produce una clara reprogramación del metabolismo de la glucosa, incrementando la glucolisis para proporcionar más precursores de numerosas vías biosintéticas (Zheng, 2012). En este sentido, cabe resaltar que la glucolisis no se limita exclusivamente a la producción energética, sino que desempeña un papel fundamental generando una gran diversidad de intermediarios metabólicos. Estos, a su vez, se dirigen hacia procesos anabólicos, como la síntesis de lípidos, la ruta de las pentosas fosfato (PPP, del inglés *Pentose Phosphate Pathway*) o el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA, del inglés *Tricarboxylic Cycle Acid*) (Berg, J.M., Tymoczko, J.L., 2014). Otro ejemplo donde es evidente la importancia de la glucolisis es durante la contracción muscular, ya que a través de esta ruta se va a generar ATP mucho más rápido que en la mitocondria mediante la fosforilación oxidativa.

En el contexto del Sistema Nervioso, la influencia de la glucolisis ha sido objeto de debate durante décadas. En los años 80, se confirma la relevancia de la glucolisis en las neuronas durante situaciones de estimulación aguda, convirtiéndose en una vía fundamental para la

producción de energía (Fox *et al.*, 1988). Asimismo, una década después, se demuestra la importancia de esta ruta metabólica en las células astrocíticas en el marco de lo que se conoce como el modelo de la "lanzadera de lactato astrocito-neurona" (ANLS, por sus siglas en inglés *Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle*) (Pellerin y Magistretti, 1994). Este modelo sugiere que los astrocitos producen lactato, uno de los principales derivados de la ruta glucolítica, y este es transportado a las neuronas vecinas que lo utilizan como fuente de energía. Este concepto se abordará en detalle más adelante. Más allá del papel como combustible, el lactato producido por los astrocitos puede jugar un papel importante como molécula señalizadora. Así, la regulación de los niveles de este metabolito puede influir en la actividad neuronal y en la transmisión sináptica (Magistretti y Allaman, 2018). No obstante, se ha observado también que las neuronas tienen la capacidad de aumentar la glucólisis y producir lactato en respuesta al aumento de la actividad, lo que subraya aún más el papel fundamental de la glucólisis en el mantenimiento de la función neuronal (Díaz-García *et al.*, 2017).

A nivel cerebral, otro aspecto interesante es la relación existente entre la glucólisis y la densidad postsináptica, que es el complejo macromolecular de señalización anclado en la membrana de las neuronas receptoras (postsinápticas), rico en proteínas, y que regula la neurotransmisión de glutamato en las sinapsis excitatorias. Las enzimas glucolíticas se encuentran enriquecidas en estas zonas integradoras de señales, por lo que la glucólisis podría proporcionar energía para mantener esta estructura dinámica (Wu *et al.*, 1997). Además, se ha observado que las enzimas involucradas en la vía glucolítica están asociadas con la bomba de sodio/potasio ATPasa, que desempeña un papel fundamental en el transporte de iones en las neuronas (Moriyama y Futai, 1990; Su *et al.*, 2003). Esta asociación sugiere que el ATP generado a través de la glucólisis se utiliza como una fuente importante de energía para el transporte de iones en las neuronas, lo que es vital para mantener una conducción adecuada de los impulsos nerviosos. A pesar de los grandes avances realizados en la comprensión de los procesos biológicos en los que la glucólisis astrocítica está implicada, todavía hay mucho desconocimiento sobre el impacto que ejerce esta sobre diferentes aspectos del metabolismo cerebral y su posible contribución en el rendimiento cognitivo. Este trabajo pretende ayudar a responder alguna de estas intrigantes cuestiones.

Definición de la ruta glucolítica

La ruta glucolítica se compone de una serie de reacciones que se suelen dividir en dos fases. La primera tiene como objetivo capturar las moléculas de glucosa dentro de la célula y convertirlas en un sustrato que se pueda transformar fácilmente en unidades fosforiladas de tres carbonos. Durante esta fase inicial no se produce energía; de hecho, se consume ATP para llevar a cabo estas transformaciones. En la segunda fase, se inicia la generación neta de energía, y culmina con la formación de piruvato (Berg, J.M., Tymoczko, J.L., 2014). Este piruvato puede entrar en la mitocondria para formar acetil-CoA o bien reducirse hasta lactato en el citosol.

Históricamente, el proceso de oxidación de la glucosa a lactato en presencia de oxígeno se ha denominado "glucolisis aeróbica". Este término confronta con la "glucolisis anaeróbica" observada en levaduras, que se caracteriza por la fermentación de la glucosa en ausencia de oxígeno y su inhibición por la presencia de este. Estas observaciones fueron realizadas por Louis Pasteur, por lo que a la inhibición de la fermentación por presencia de oxígeno se le conoce como **efecto Pasteur** (Pasteur, 1861). Más tarde, Otto Warburg observó que este fenómeno no se cumple en cortes de tumores, en los que, aún en presencia de oxígeno, existe un gran predominio de la glucolisis (Warburg, 1925). A esta observación se le denomina **efecto Warburg**, y sugiere un desequilibrio en la inhibición de la fosforilación oxidativa en relación con la glucolisis, permitiendo que esta última prevalezca incluso en ambientes de oxigenación adecuada. Asimismo, existe una variante conocida como **efecto Crabtree**, donde la inhibición del metabolismo oxidativo mitocondrial está causada directamente por la propia ruta glucolítica (Barros *et al.*, 2021).

A menudo, estos conceptos han sido un foco de debate y ambigüedad, pero han contribuido a la confirmación de una interacción entre la ruta glucolítica y fosforilación oxidativa mitocondrial, principal consumidora de oxígeno en la célula. En resumen, estos conceptos resaltan la modulación del metabolismo energético en diversas condiciones y tipos celulares.

En este trabajo, el término "glucolisis" hará referencia a la oxidación de la glucosa a piruvato, independientemente de cuál sea el destino final de este último, y de la presencia o ausencia de oxígeno.

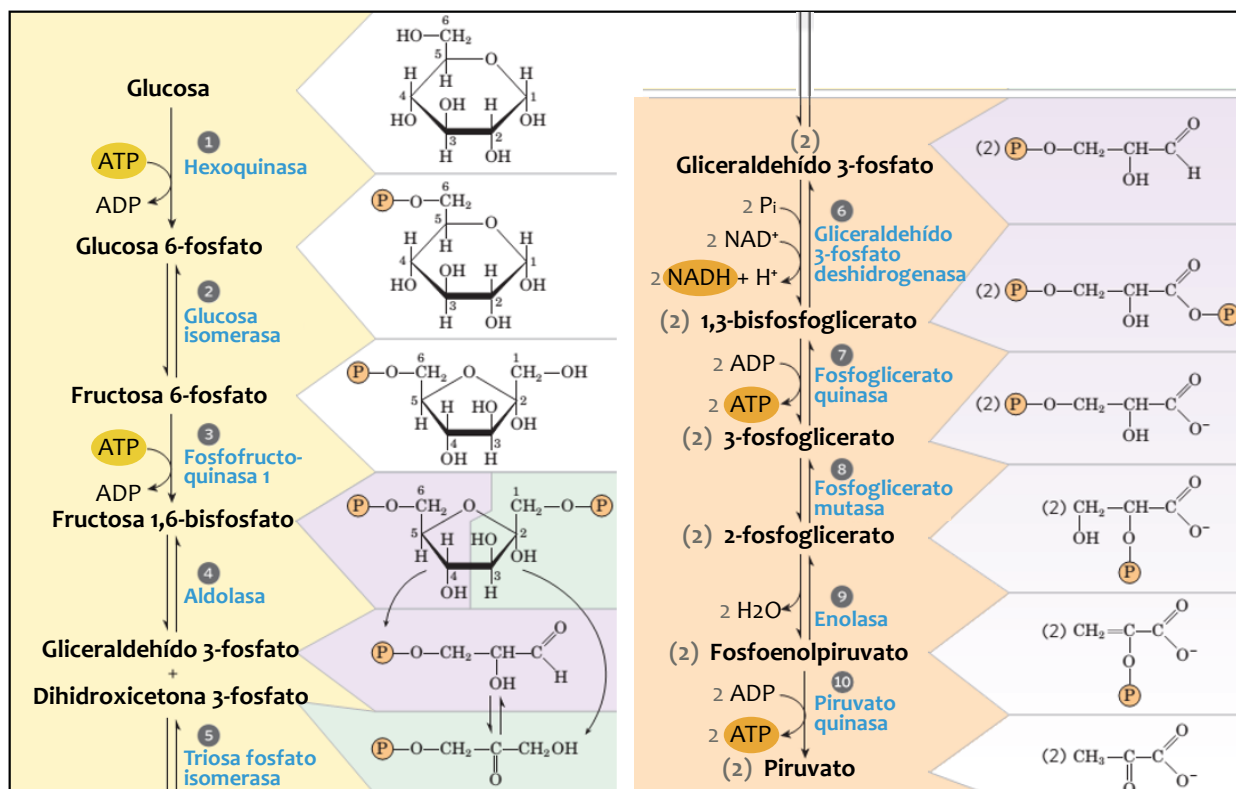
Etapas de la ruta glucolítica

Antes de entrar a formar parte de cualquier ruta metabólica, la glucosa debe entrar al interior celular. La demanda de energía del cerebro, que está cubierta por el suministro de glucosa de la sangre, se garantiza por la presencia de transportadores de glucosa (GLUT) en los capilares y en las células cerebrales. Aproximadamente un 20 % de la glucosa ingerida por un adulto es consumida por este órgano, en el que se expresan los transportadores de difusión facilitada GLUT1-6 y GLUT8, y otros dependientes de sodio, como SGLT1 (Bélanger, Allaman y Magistretti, 2011; Signal *et al.*, 2012; Mergenthaler *et al.*, 2013; Koepsell, 2020). Una vez dentro, la glucosa dirigida hacia glucolisis sufre una serie de reacciones (**Tabla 1**), que se pueden dividir en una fase de inversión y otra de producción de energía.

Etapas	Reacción	Enzima	Tipo de reacción
1	$\text{Glucosa} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glucosa 6-fosfato} + \text{ADP} + \text{H}^+$	Hexoquinasa	Transferencia de fosforilo
2	$\text{Glucosa 6-fosfato} \rightleftharpoons \text{Fructosa 6-fosfato}$	Fosfoglucosa isomerasa	Isomerización
3	$\text{Fructosa 6-fosfato} + \text{ATP} \rightarrow \text{Fructosa 1,6-bisfosfato} + \text{ADP} + \text{H}^+$	Fosfofructoquinasa	Transferencia de fosforilo
4	$\text{Fructosa 1,6-bisfosfato} \rightleftharpoons \text{Dihidroxiacetona fosfato} + \text{gliceraldehído 3-}$	Aldolasa	Escisión aldólica
5	$\text{Dihidroxiacetona fosfato} \rightleftharpoons \text{Gliceraldehído 3-fosfato}$	Triosa isomerasa	Isomerización
6	$\text{Gliceraldehído 3-fosfato} + \text{NAD}^+ + \text{Pi} \rightleftharpoons \text{1,3-fosfoglicerato} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Gliceraldehído deshidrogenasa	Fosforilación acoplada a oxidación
7	$\text{1,3-Fosfoglicerato} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{3-fosfoglicerato} + \text{ATP}$	Fosfoglicerato quinasa	Transferencia de fosforilo
8	$\text{3-fosfoglicerato} \rightleftharpoons \text{2-fosfoglicerato}$	Fosfoglicerato mutasa	Migración interna de fosforilo
9	$\text{2-fosfoglicerato} \rightleftharpoons \text{Fosfoenolpiruvato} + \text{H}_2\text{O}$	Enolasa	Deshidratación
10	$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{ADP} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Piruvato} + \text{ATP}$	Piruvato quinasa	Transferencia de fosforilo

Tabla 1. Reacciones de la glucolisis. Se muestran las 10 reacciones ocurridas desde glucosa a piruvato. Se suelen dividir en dos etapas: una de inversión (**Reacciones 1-5**) y otra de producción (**Reacciones 6-10**) de ATP. Se incluyen las **enzimas** implicadas en cada reacción, así como el tipo de reacción producida.

A continuación, se muestra un esquema que incluye la estructura de los sustratos/productos pertenecientes a la ruta glucolítica (**Esquema 1**), y las enzimas implicadas.



Esquema 1. Reacciones de la glucólisis. En esta imagen (modificada de Berg, J.M., Tymoczko, J.L., 2014), se pueden observar las diez reacciones de la glucólisis, incluyendo la fosforilación de la hexoquinasa. En amarillo se indican los pasos de la fase de inversión y en naranja los de producción de energía. Se muestra la estructura bioquímica de los intermediarios, junto con las enzimas implicadas (en azul).

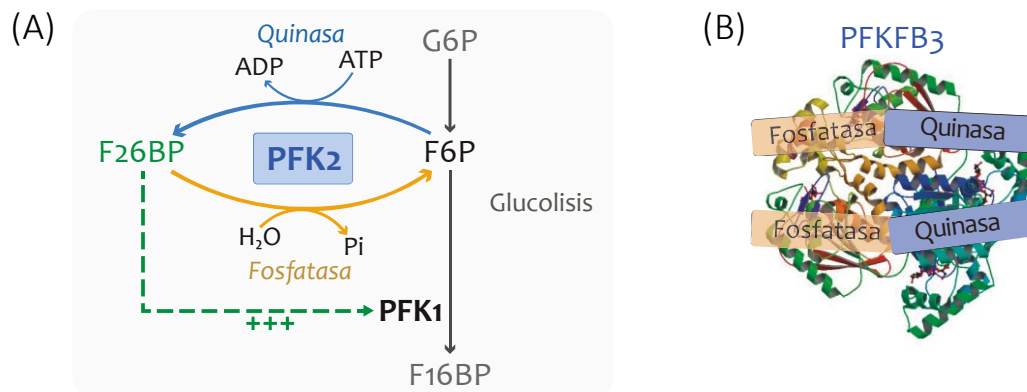
Fase de inversión de energía

Una vez dentro de la célula, la glucosa va a ser fosforilada por una enzima denominada **hexoquinasa** (**Tabla 1, reacción 1**). De esta manera, se forma glucosa 6-fosfato (G6P), que ya no es susceptible de la acción de los transportadores de glucosa, quedando atrapada en el interior celular. Además, la adición del grupo fosforilo la hace menos estable, facilitando los siguientes pasos de la ruta (Berg, J.M., Tymoczko, J.L., 2014). Aunque muchas veces la conversión de glucosa a G6P se considera la primera reacción de la glucólisis, hay que tener en cuenta que no es exclusiva de esta vía, ya que es el paso directamente concomitante a la entrada de la glucosa, sea cual sea su destino final.

Si la G6P toma el destino de la vía glucolítica, la enzima **fosfoglucoisomerasa** la convierte en fructosa 6-fosfato (F6P) (**Tabla 1, reacción 2**). Esta última es el sustrato de la principal enzima reguladora de la glucólisis, la **fosfofructoquinasa-1** (PFK1) (**Tabla 1, reacción 3**), que va a fosforilar la F6P, a expensas de una molécula de ATP, a fructosa 1,6-bisfosfato (F16BP). La PFK1 es una enzima alostérica, cuya regulación se detallará en el siguiente apartado del trabajo. Sin embargo, cabe mencionar su principal regulador alostérico, la fructosa-2,6-bisfosfato (F26BP),

que es producida por una enzima tradicionalmente conocida como fosfofructoquinasa-2 o PFK2.

La PFK2 está estrechamente relacionada con la glucolisis, puesto que su sustrato es la F6P, intermediario de la ruta. A partir de este metabolito y con gasto de energía en forma de ATP, produce F26BP, regulador alostérico positivo de la PFK1. Además, esta enzima es bifuncional, presentando a la vez función quinasa y fosfatasa. De este modo, es capaz de realizar la reacción inversa, liberando un fosfato inorgánico (Pi) (**Esquema 2A**). La isoforma 3 de la PFK2 o PFKFB3 (6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-3) es la protagonista de este trabajo. Es la predominante en el tejido cerebral y, como veremos, se caracteriza por presentar una actividad fosfatasa mínima (Sakai *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2006), de modo que va a producir grandes cantidades de F26BP, acelerando el flujo glucolítico (**Esquema 2B**).



Esquema 2. Reacción catalizada por la PFK2 y estructura de la isoforma 3.

La PFK2 cataliza la fosforilación de la fructosa 6-fosfato (F6P) en fructosa 2,6-bisfosfato (F26BP), regulador alostérico positivo de la PFK1 (A). Como enzima bifuncional, cataliza la reacción contraria.

Se muestra la estructura dimérica de la isoforma 3 de la PFK2 (PFKFB3), que presenta una actividad fosfatasa muy reducida (B).

La primera fase culmina con la escisión de la F16BP en dos moléculas de 3 carbonos, catalizada por la aldolasa (Tabla 1, reacción 4). Estas dos moléculas son la dihidroxiacetona 3-fosfato (DHAP) y el gliceraldehído 3-fosfato (GA3P); encontrándose sólo esta última en la vía directa de la glucolisis. Se trata de isómeros rápidamente interconvertibles por la triosa fosfato isomerasa (Tabla 1, reacción 5). Aunque en equilibrio la predominante sería la DHAP, la reacción discurre fácilmente hacia el GA3P por ser este oxidado en las siguientes reacciones de la vía glucolítica (Berg, J.M., Tymoczko, J.L., 2014).

Fase de producción de energía

Desde este punto, se inicia la segunda fase de la glucólisis, centrada en la obtención de energía a partir de los dos GA3P generados en la primera fase a partir de una única molécula de glucosa. El primer paso es su conversión a 1,3-bisfosfoglicerato, por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, convirtiendo una molécula de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), de su forma oxidada (NAD⁺) a su forma reducida (NADH) (**Tabla 1, reacción 6**).

En la siguiente reacción se va a aprovechar el alto potencial de transferencia del grupo fosforilo para generar una molécula de ATP. De esta manera se recupera la energía empleada en la primera fase. La enzima responsable es la fosfoglicerato quinasa, que produce 3-fosfoglicerato (**Tabla 1, reacción 7**) que, posteriormente, será convertido en 2-fosfoglicerato por la acción de la fosfoglicerato mutasa (**Tabla 1, reacción 8**) (Berg, J.M., Tymoczko, J.L., 2014).

El paso consecutivo es una deshidratación, por la que la enolasa produce fosfoenolpiruvato (PEP) (**Tabla 1, reacción 9**). Finalmente, la piruvato quinasa (PK), otra enzima clave en la regulación de la glucólisis, es la encargada de generar el producto final, el piruvato, además de una molécula de ATP (**Tabla 1, reacción 10**). Facilita la transferencia directa del fosfato desde el PEP hacia el adenosín difosfato (ADP). La conversión a una forma ceto más estable, posibilita que esta transferencia sea energéticamente favorable (Israelsen y Vander Heiden, 2015).

2. Regulación de la glucólisis y PFKFB3

Control de la ruta glucolítica

Regulación de la entrada de la glucosa

La glucosa, altamente hidrófila, debe atravesar varias barreras para acceder al intersticio cerebral, los ventrículos cerebrales y los órganos circunventriculares. La barrera hematoencefálica (BHE) está formada por células endoteliales conectadas por uniones estrechas, por lo que los transportadores GLUT presentes en estas membranas, son esenciales para que la glucosa alcance las células cerebrales. La mayor parte de los transportadores se regulan por su translocación a la membrana plasmática, al encontrarse secuestrados en vesículas en el citosol. De igual modo, es importante su regulación por cambios en los niveles de expresión génica.

El gradiente de concentración entre la glucosa en la sangre y el intersticio cerebral permite la

difusión pasiva de glucosa a través de la BHE hacia el cerebro (Patching, 2017). El transportador más abundante es GLUT1 y lo encontramos tanto en células endoteliales de la BHE como en astrocitos y oligodendrocitos. Dentro de los astrocitos, se expresa altamente en los pies dendríticos que envuelven los capilares cerebrales. También aparece, aunque en menor cantidad, en neuronas y microglía. En respuesta a la actividad neuronal, GLUT1 puede translocarse hacia la membrana celular para facilitar una mayor captación de glucosa. Se ha comprobado que la fosforilación por parte de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en astrocitos, desestabiliza la proteína de interacción tiorredoxina, provocando la translocación de GLUT1 a la membrana plasmática (Muraleedharan *et al.*, 2020).

En las neuronas, el principal transportador es GLUT3, de alta afinidad, lo que le permite captar glucosa de manera eficiente incluso cuando los niveles en sangre son bajos. También es capaz de translocarse a la superficie neuronal en respuesta a la actividad sináptica (Ferreira, Burnett y Rameau, 2011). GLUT2 y GLUT4 pueden participar en funciones específicas en áreas cerebrales y condiciones fisiológicas especiales. En referencia a los transportadores dependientes de sodio, el principal es SGLT1, que se expresa de forma ubicua en las neuronas, y adquiere vital importancia en situaciones de hipoglucemia e hipoxemia. Además, también se encuentra en las células endoteliales, donde participa en la eliminación de la glucosa del intersticio cerebral, por ejemplo ante una glucotoxicidad durante la reperfusión tras isquemia cerebral (Koepsell, 2020).

Regulación de la hexoquinasa

La hexoquinasa presenta múltiples isoformas con expresión tisular diferencial. La isoforma I es ubicua pero predominante en el cerebro. En astrocitos se presenta exclusivamente esta isoforma, mientras que en neuronas podemos encontrar también las isoformas II y III (Lundgaard, Li, Xie, Kang, Sanggaard, Sun, *et al.*, 2015). Además, se ha visto una mayor cantidad de hexoquinasa en neuronas en comparación con astrocitos, lo que podría asegurar una mayor retención de la glucosa en estas células que se encuentran más alejadas de los vasos sanguíneos. En cuanto a la isoforma I, se inhibe con altas concentraciones del producto final G6P, pero esta inhibición se antagoniza con bajos niveles de fosfato (Wilson, 2003). Los cambios en G6P y fosfatos están vinculados al estado energético celular, lo que la hace una enzima idónea en el control de funciones catabólicas. Adicionalmente, esta isoforma tiene una secuencia de anclaje mitocondrial (dominio de porina), que le permite asociarse con la

membrana externa mitocondrial (MEM) y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, del inglés *Voltage-Dependent Anion Channel*), facilitando el acceso preferencial de enzimas y metabolitos glucolíticos al ATP cercano, el producido por la mitocondrial (Rodríguez-Saavedra *et al.*, 2021).

Regulación de la PFK1

PFK1 es una enzima glucolítica esencial y destaca por su cinética alostérica, su estructura oligomérica y por su compleja regulación. En mamíferos, existen tres genes que codifican para las tres isoformas de la PFK1: PFK-M, PFK-L y PFK-P (o C). Las diferentes isoformas pueden combinarse en forma de homotetrámeros o heterotetrámeros según el tipo celular, generando complejos con propiedades alostéricas y cinéticas diferentes. La expresión de unas u otras puede marcar una fuerte diferencia en la eficiencia glucolítica (Zancan *et al.*, 2010). En cerebro, podemos encontrar las tres isoformas, siendo la PFK-L la minoritaria. No obstante, la existencia de las tres isoformas podría ser una forma de asegurar el mantenimiento de la glucólisis bajo cualquier condición (Kanai *et al.*, 2019).

Esta enzima está modulada por una variedad de ligandos alostéricos, incluidos sus sustratos, los productos de reacción y varios otros metabolitos como AMP, F26BP o citrato, entre otros. Según estudios filogenéticos y estructurales, la PFK1 de mamíferos surge de la duplicación, fusión en tándem y posterior divergencia de un gen procariótico ancestral. Como resultado, posee sitios adicionales que han evolucionado hasta convertirse en los sitios alostéricos conocidos para el ATP y la F26BP (Sola-Penna *et al.*, 2010). El ATP inhibe alostéricamente a la PFK1 en su rango de concentración fisiológico, aunque podría llegar a activarla a concentraciones muy bajas. El citrato, procedente del TCA, también actúa como inhibidor, aunque normalmente necesita concentraciones relativamente altas para ejercer su papel. La F26BP, el principal regulador alostérico, es capaz de revertir los efectos inhibitorios del ATP y del citrato (Zancan *et al.*, 2007). Otros activadores de la PFK1 son el AMP y los iones de potasio. En cambio, un pH bajo inhibe la actividad de PFK1, disminuyendo su afinidad por la F6P (Marin-Hernandez *et al.*, 2009).

Las distintas isoformas pueden presentar características cinéticas y regulación diferentes. Por ejemplo, la PFK1-M tiene una alta afinidad por su sustrato F6P y es menos sensible a la inhibición por ATP y citrato, en comparación con las isoformas PFK1-P y PFK1-L. El papel diferencial de los activadores como la F26BP y el AMP no está claro actualmente (Marin-

Hernandez *et al.*, 2009).

Parte de los efectos que ejercen los reguladores alostéricos se basan en su capacidad para modular el equilibrio entre las formas diméricas (inactivas) y tetraméricas (activas) de la PFK1. Mientras el ATP, el citrato y el lactato tienden a estabilizar la conformación dimérica de la enzima, inhibiéndola; otros metabolitos como el ADP, el AMP, el AMP cíclico y la F26BP favorecen la formación de tetrámeros, activándola. Esta regulación permite ajustar la actividad de la PFK1 en respuesta a las necesidades metabólicas de la célula (Sola-Penna *et al.*, 2010). El lactato regula el flujo glucolítico mediante la modulación de PFK1 debido a sus efectos sobre la estructura cuaternaria de la enzima, favoreciendo la disociación de los tetrámeros. Este efecto puede prevenirse mediante condiciones estabilizadoras del tetrámero, como la presencia de F26BP (Costa Leite *et al.*, 2007).

Por otro lado, los acil-CoA de cadena larga regulan la actividad de PFK1 a través del sitio alostérico al que se unen los nucleótidos AMP/ADP. Por tanto, los acil-CoA de cadena larga inhiben a la PFK1 en condiciones de plenitud energética, cuando este sitio alostérico está libre, pero no en condiciones deficitarias donde es necesario poner a funcionar la vía glucolítica. De este modo, pueden proteger a la célula en situaciones patológicas como una isquemia o hipoxia (Jenkins *et al.*, 2011).

En el contexto cerebral, se observa que la actividad de la PFK1 es aproximadamente cuatro veces mayor en los astrocitos en comparación con las neuronas, y esta diferencia radica en una menor presencia de F26BP en las neuronas. En relación con las diferentes variantes de la enzima PFK1, se ha detectado la presencia de las tres isoformas en ambos tipos celulares, aunque la isoforma PFK1-P es aproximadamente cuatro veces más abundante en los astrocitos. Esta diferencia en la proporción de isoformas sugiere la posibilidad de que PFK1-P desempeñe una función especializada en los astrocitos, como la relacionada con las respuestas específicas observadas ante la exposición al óxido nítrico (Almeida, Moncada y Bolaños, 2004).

A pesar de la gran cantidad de metabolitos que regulan la PFK1, queda claro que el principal director es la F26BP, producida por la PFK2. Esta enzima también presenta varias isoformas, siendo la isoforma 3 (PFKFB3), la predominante en cerebro. Las características y regulación de esta enzima se tratarán a lo largo del trabajo con mayor detalle. En este contexto, cabe mencionar otro regulador indirecto de la PFK1, TIGAR (del inglés, *TP53 inducible glycolysis and apoptosis regulator*), una enzima con actividad 2,6-bisfosfatasa que reduce los niveles

intracelulares de F26BP, lo que resulta en una inhibición de la glucólisis y estimulación de la PPP. Es importante señalar que TIGAR se encuentra tanto en astrocitos como en neuronas. Sin embargo, los estudios en cultivos revelan que, mientras en astrocitos su localización se restringe al citosol, en neuronas también puede hallarse en el núcleo. Esta observación sugiere que TIGAR puede desempeñar funciones nucleares, posiblemente vinculadas a su rol en la preservación de la supervivencia neuronal (Rodríguez-Rodríguez, 2013). Un hallazgo interesante es la capacidad de TIGAR de interactuar con el factor de transcripción Nrf2 (del inglés, *Nuclear factor erythroid-derived 2 - like 2*), lo que desencadena la activación de mecanismos antioxidantes (Wang *et al.*, 2022).

Regulación de la piruvato quinasa

La PK también presenta diferentes isoformas (PKM1, PKM2, PKR y PKL) y es activa en su forma tetramérica. Aunque un tejido puede expresar más de una variante, las células individuales generalmente expresan solo una. La isoforma PKM1 se suele encontrar en tejidos con alta demanda catabólica (Israelsen y Vander Heiden, 2015). En el cerebro, se expresa abundantemente en las neuronas, mientras que PKM2 es específica de los astrocitos (Wei *et al.*, 2020).

La PK se regula principalmente por alosterismo a través de diferentes metabolitos que pueden alterar su afinidad por el propio sustrato, el PEP. En mamíferos, las diferentes isoformas comparten alta afinidad no cooperativa por el ADP, siendo insensibles a efectores alostéricos en presencia de este. En ausencia de activadores alostéricos, la isoforma PKM2 exhibe baja afinidad por el PEP, pero cooperatividad positiva tras la unión de este. La F16BP es su principal efector alostérico positivo, ya que aumenta la afinidad de la PKM2 por la PEP al unirse a un sitio específico en cada subunidad, diferente al sitio activo. Esta interacción promueve la tetramerización y estabiliza el estado activo de la enzima. Este fenómeno de cooperatividad no ocurre en la isoforma PKM1, donde la F16BP no se une debido a diferencias estructurales. No obstante, la PKM2 activada por F16BP presenta parámetros cinéticos similares y estructuras tridimensionales cercanas a la PKM1 (Lee *et al.*, 2022). Otros metabolitos como la fenilalanina, la alanina y la serina pueden también regular alostéricamente la enzima, aunque sus efectos son modestos y requieren altas concentraciones, por lo que su relevancia fisiológica no está clara. La serina actúa como efector positivo, mientras que la fenilalanina reduce su afinidad por el PEP.

Otro mecanismo de regulación de la enzima es por fosforilación. Esta modificación postraduccional puede ser inducida por señales de crecimiento, y conduce a la liberación de su activador alostérico F16BP, reduciendo su actividad (Yuan *et al.*, 2018).

PKM2 no solo media el metabolismo de la glucosa para generar piruvato y ATP en el citoplasma, sino que también provoca un efecto Warburg, translocándose al núcleo y modulando la reprogramación transcripcional de genes glucolíticos a través del factor de transcripción HIF-1 (del inglés, *Hypoxia Inducible Factor*). Bajo estrés oxidativo, PKM2 se traslada a las mitocondrias y se metila. Esto termina por reducir la entrada de calcio en las mitocondrias, favoreciendo la glucólisis aeróbica en detrimento de la fosforilación oxidativa (Lee *et al.*, 2022). Por otro lado, la activación de PKM2 por un receptor de dopamina parece estar relacionada con la activación de la vía de *Nrf2* (Wei *et al.*, 2020). De este modo, PKM2 puede desempeñar un papel crucial en la regulación del metabolismo celular y en la protección contra el estrés oxidativo en astrocitos.

Destino del piruvato

Una vez finalizada la ruta glucolítica, el piruvato como producto final podrá entrar en la mitocondria o bien reducirse a lactato en el citosol. Una vez dentro de la mitocondria, a la cual puede acceder a través de los transportadores de piruvato (MPC, del inglés *mitochondrial pyruvate carrier*), el complejo de la piruvato deshidrogenasa va a catalizar su descarboxilación oxidativa irreversible para formar acetil-CoA y NADH. La regulación rápida de este complejo está mediada principalmente por la fosforilación reversible de tres residuos de serina en uno de sus componentes principales, la piruvato deshidrogenasa (PDH), que inactiva el complejo. En los astrocitos, en comparación con las neuronas, la PDH está más fosforilada y, por lo tanto, su actividad se ve reducida, alterando el metabolismo glucolítico y favoreciendo la producción de lactato a partir del piruvato (Halim *et al.*, 2010). Aunque la fosforilación es clave para la inactivación de este complejo, se han identificado otras regulaciones a través de la acetilación y la succinilación. En neuronas, se ha observado que la acción de la sirtuína 5, que cataliza principalmente la eliminación de grupos succinilo, se corresponde con una disminución de la actividad de la PDH (Park *et al.*, 2013). En cambio, favorece tanto la oxidación de los ácidos grasos como la autofagia (Rardin *et al.*, 2013; Koronowski *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2021).

La otra alternativa del piruvato es su reducción a lactato, catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH) mediante una reacción reversible. Existen diferentes isoformas, y cada

una de estas isoformas determina el metabolismo característico de cada tipo celular del cerebro. En astrocitos se expresa LDH5, que presenta una mayor afinidad por el piruvato, favoreciendo su transformación a lactato. En cambio, las neuronas expresan LDH1, que favorece la reacción opuesta, la transformación de lactato a piruvato. El lactato generado va a entrar y salir de la célula por transportadores de monocarboxilatos (MCT, del inglés *MonoCarboxylate Transporter*), y a este nivel también encontramos diferencias entre ambos tipos celulares. Por un lado, la isoforma MCT1 se encuentra tanto en endotelio como en astrocitos, mientras que MCT4 es específico de estos últimos. La isoforma de mayor afinidad es la MCT2, que se encuentra específicamente en las neuronas, favoreciendo la captación de lactato (Pierre y Pellerin, 2005). Esta distribución diferencial refleja las diferencias metabólicas entre astrocitos y neuronas apoyando el modelo ANLS que se discutirá en los siguientes apartados del trabajo.

Descubrimiento y variantes de la PFK2 (o PFKFB)

Descubrimiento de la PFK2

En 1980, un grupo de Lovaina enfocado en los efectos del glucagón sobre la gluconeogénesis y la glucolisis hepáticas, descubre una molécula en un extracto hepático, la F26BP, que contrarresta los efectos del glucagón al activar a la PFK1, promoviendo la glucolisis (Van Schaftingen, Hue y Hers, 1980). Un año más tarde, en Tennessee, otro laboratorio confirma estos hallazgos y demuestra que la F26BP también inhibe a la fructosa-2,6-bisfosfatasa (Pilkis *et al.*, 1981). Ese mismo año, otro grupo estadounidense, identifica la proteína encargada de producir F26BP a partir de F6P y ATP (Uyeda, Furuya y Luby, 1981). A esta enzima se le denomina 6-fosfofructo-2-kinasa, y acaba renombrándose como fosfofructoquinasa 2 (PFK2). En 1982, paralelamente ambos grupos descubren otra enzima que degrada F26BP a F6P y Pi, que coprecipita con la PFK2, y se activa por glucagón (Furuya, Yokoyama y Uyeda, 1982; Van Schaftingen, Davies y Hers, 1982).

Finalmente, en 1983, Pilkis y su equipo determinan que las actividades de síntesis y degradación de F26BP coexisten en una misma enzima bifuncional, que finalmente se nombra como 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa o PFKFB (EC 2.7.1.105) (Pilkis *et al.*, 1983). Aunque el nombre de PFK2 se sigue utilizando actualmente, el uso de PFKFB es el preferible para denominar las distintas isoformas de esta enzima.

Isoformas y estructura de la PFK2

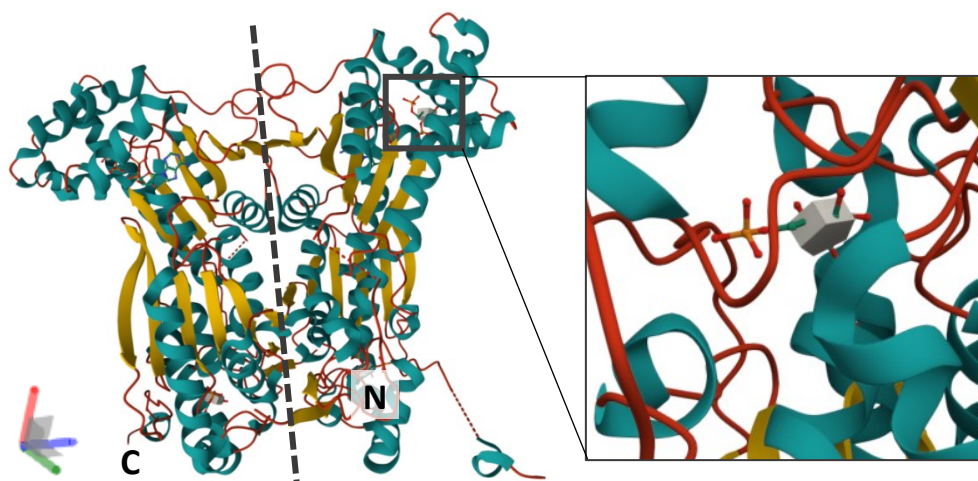
La PFK2 es una enzima bifuncional que se engloba dentro de una categoría especial de proteínas, conocidas por catalizar dos reacciones opuestas. Está localizada en el citosol y es activa en forma homodimérica. El gen de la *Pfk2* se encuentra en la mayoría de los eucariotas, pero está ausente en procariotas, a excepción de *Trypanosoma brucei* y *Euglena gracilis* (Michels y Rigden, 2006).

La evolución de la PFK2 en eucariotas tempranos implica la fusión de los dominios de quinasa y fosfatasa, dando lugar al sucesor bifuncional. El dominio quinasa, en la mitad N-terminal, está relacionado estructuralmente con la familia de proteínas de unión a mononucleótidos. En la mitad C-terminal, se encuentra el dominio fosfatasa que está relacionado con las histidina fosfatasas. A lo largo de la evolución, ha sufrido diferentes procesos de duplicación, pérdida de función de alguno de los dominios y, en general, se ha transformado de forma divergente, conduciendo al desarrollo de isoformas que se expresan en diferentes tejidos y etapas del desarrollo (Michels y Rigden, 2006).

En mamíferos existen cuatro isoenzimas, expresadas por 4 genes distribuidos en cromosomas diferentes, que se nombran según el tejido en inglés del cual se han purificado por primera vez y, posteriormente, con un número: de hígado (PFKFB1), de corazón (PFKFB2), de cerebro (o placenta) (PFKFB3) y de testículos (PFKFB4) (Rider *et al.*, 2004). Cada uno de estos genes no solo codifica para la isoforma correspondiente, sino que también aparecen variantes mediante corte y empalme alternativo diferencial (*splicing* en inglés), que permiten una regulación precisa en distintos tejidos y en respuesta a multitud de señales (Rider *et al.*, 2004). Las isoformas muestran una homología genética de alrededor del 60%, siendo las más similares la *Pfkfb1* y la *Pfkfb4*, con algo más del 70 %. La región central de la proteína donde residen las actividades catalíticas se encuentra altamente conservada. No obstante, las escasas variaciones circundantes al sitio activo conllevan diferencias cinéticas importantes. Por otro lado, los extremos amino y carboxilo difieren ampliamente entre las distintas isoformas y especies (Michels y Rigden, 2006).

El gen *Pfkfb3*, compuesto por un mínimo de 16 exones en mamíferos, codifica una enzima originalmente aislada en el cerebro bovino y en la placenta humana. Mediante corte y empalme alternativo del exón 15 y la utilización diferencial del promotor, se generan las dos variantes principales conocidas, diferenciadas en su secuencia C-terminal; la variante ubicua y

la inducible. La expresión de la isoforma inducible es baja en tejidos adultos, elevada en células cancerosas y se incrementa en respuesta a estímulos proinflamatorios. Se caracteriza por la existencia de múltiples repeticiones de la secuencia AUUUA en la región 3' no traducida, un patrón que inestabiliza el mensajero, permitiendo un grado mayor de regulación de los niveles proteicos. Esta secuencia no se encuentra en otras isoformas de la PFK2 (Chesney *et al.*, 1999). A continuación, se muestra la estructura tridimensional del dímero de la PFKFB3 inducible, que se cristalizó por primera vez en 2006, señalando el sitio de unión de la F6P del dominio quinasa (**Esquema 3**). Presenta varias láminas β (amarillo), algunas en forma de horquillas β , y hélices α (azul). En una estructura de horquilla β , el extremo N-terminal interactúa con el dominio bisfosfatasa asegurando la unión de la F6P y retrasando su liberación del complejo. El dominio regulador C-terminal está mayormente desordenado, dejando expuesto el bolsillo activo del dominio bisfosfatasa (Kim *et al.*, 2006).



Esquema 3. Estructura detallada de la PFKFB3 inducible humana y dominio de unión a F6P. Se muestran la estructura dimérica de la PFKFB3 inducible, con la representación de la estructura secundaria en láminas β y hélices α . El dominio quinasa está situado en la parte superior, mientras que el fosfatasa en la inferior. La línea discontinua separa el dímero en sus dos estructuras monoméricas. Se indica el final del extremo carboxilo (C) y amino (N) del monómero de la izquierda. En la ampliación se muestra el bolsillo de unión a F6BP del dominio quinasa. Extraído de Protein Data Bank.

Existen otras variantes de empalme con algunas diferencias importantes, particularmente en la longitud del extremo N-terminal. (Michels y Rigden, 2006). En el cerebro humano, se han encontrado hasta seis variantes de empalme para la PFKFB3 que resultaban de la combinación de diferentes exones del extremo C-terminal (Kessler y Eschrich, 2001). Actualmente, podemos encontrar al menos 11 variantes documentadas en la literatura y en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Heydasch *et al.*, 2021).

La isoforma PFKFB3 se expresa en una amplia variedad de tejidos, pero su relevancia ha sido

especialmente resaltada en células cancerosas. De hecho, los elevados niveles de expresión de *Pfkfb3* pueden contribuir a la explicación del fenómeno Warburg en las células tumorales. En el tejido cerebral es la isoforma predominante, aunque también podemos encontrar una abundancia notable de PFKFB2, y más reducida de las otras isoformas (Minchenko, Opentanova y Caro, 2003). Si se compara la abundancia relativa de PFKFB3 entre neuronas y astrocitos, estos últimos presentan niveles de enzima muy superiores al de las neuronas (Herrero-Mendez *et al.*, 2009).

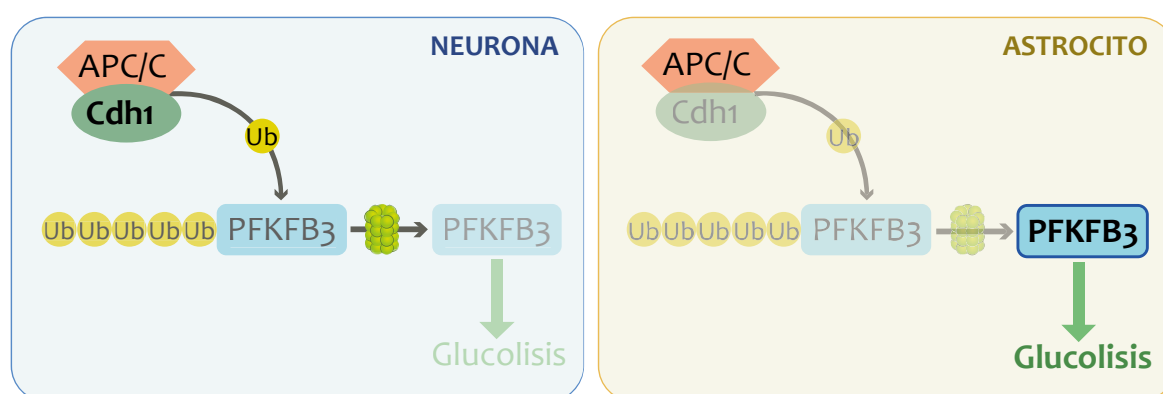
La PFKFB3 destaca por su excepcionalmente elevada relación de actividad quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa, en comparación con otras isoformas. La mayor actividad quinasa de la enzima se ha encontrado en placenta, siendo 700 veces superior a la actividad bisfosfatasa (Sakai *et al.*, 1996). Se ha comprobado que la baja actividad bisfosfatasa de la PFKFB3 se debe a la presencia de una serina en el residuo 302, en lugar de una arginina conservada en otras isoformas de la enzima (Kim *et al.*, 2006). No obstante, la actividad bisfosfatasa está influenciada por varios factores, incluyendo la presencia de ciertos residuos en su estructura y cambios conformacionales inducidos por la falta de sustrato en el sitio activo (Cavalier *et al.*, 2012).

Regulación de la PFK2

La regulación de la PFK2 es compleja y puede variar dependiendo de la isoforma, incluso dentro de las distintas variantes de la misma isoforma. Como cofactores generales de la PFK2 encontramos el AMP (adenosina monofosfato), el ATP, el GMP (guanosina monofosfato) y el IMP (inosina monofosfato). Además, tanto el ion magnesio como el Pi son necesarios para su actividad. La presencia del Pi incrementa la velocidad máxima de la enzima y reduce la Km para la F6P.

En el contexto del Sistema Nervioso, la regulación principal se produce mediante la degradación de la enzima. Investigando los posibles motivos dirigidos a la ubiquitinación y degradación de la proteína, se descubre que solo la isoforma 3 contiene una caja KEN. En las neuronas, esta secuencia permite a la proteína convertirse en un sustrato del complejo de APC/C-Cdh1 (del inglés, *Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*) para su ubiquitinación y degradación por la vía ubiquitina-proteasoma. Al presentar elevados niveles de este complejo, la PFKFB3 está siendo continuamente degradada en neuronas (**Esquema 4**). Sin embargo, en astrocitos, esta degradación permanente de PFKFB3 se previene gracias a los bajos niveles que

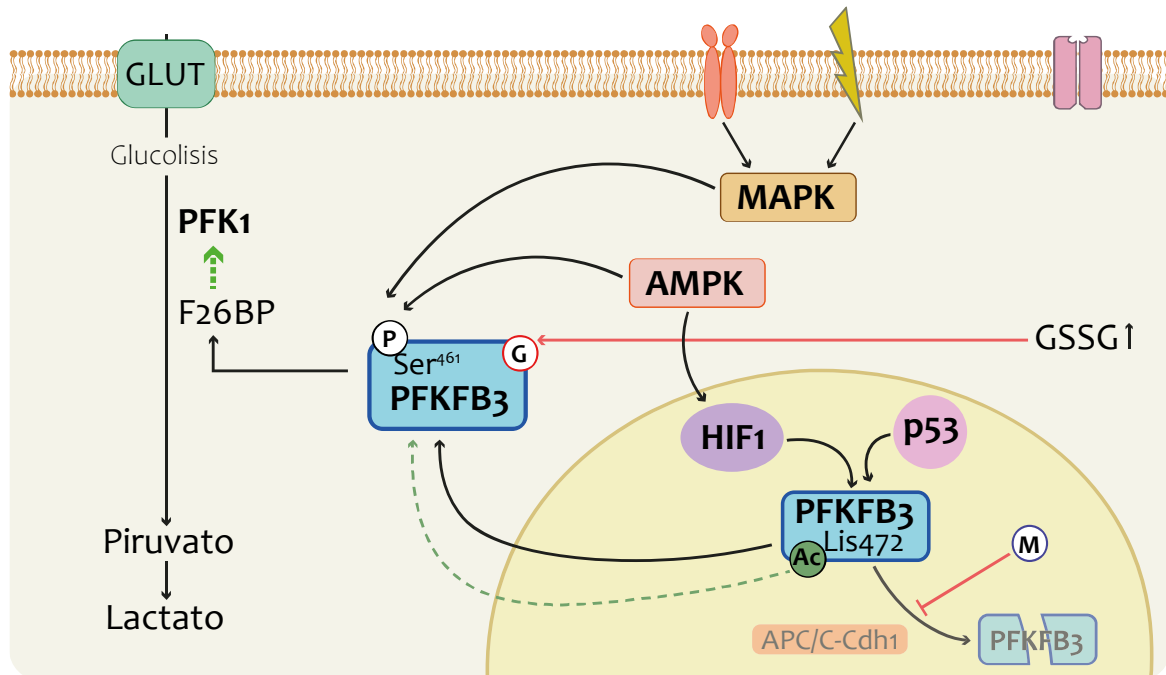
presentan de Cdh1 (Herrero-Mendez *et al.*, 2009). Esto conlleva a un metabolismo diferencial del uso de glucosa entre neuronas y astrocitos. Mientras que las primeras presentan niveles reducidos de glucólisis destinando principalmente la glucosa por la vía PPP, estos últimos muestran un fenotipo fuertemente glucolítico. La estabilización de la PFKFB3 en neuronas tras la estimulación de receptores NMDA (N-metil-D-aspartico), o bien tras el bloqueo de su degradación por APC/C-Cdh1, conduce a un aumento de la ruta glucolítica en detrimento de la PPP. Esto desencadena estrés oxidativo y apoptosis, demostrando la importancia de mantener unos niveles bajos de PFKFB3 y, en consecuencia, de glucólisis en las neuronas (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012).



Esquema 4. Regulación de la PFKFB3 por APC/C-Cdh1. En neuronas, la PFKFB3 está constantemente sometida a la degradación proteasomal tras su ubiquitinación por el complejo APC/C-Cdh1. En astrocitos se previene esta degradación al mantener bajos los niveles de Cdh1, lo que conduce al incremento de los niveles de PFKFB3, responsables del fenotipo glucolítico de estas células.

La PFK2 y, particularmente la PFKFB3, también puede regularse mediante modificaciones postraduccionales, como la fosforilación (**Esquema 5**). Un residuo clave es la serina 461 (Ser461) en el dominio C-terminal, común a todas las isoformas, excepto para la PFKFB1. La fosforilación de este residuo eleva sustancialmente la actividad quinasa de la PFK2 y disminuye el valor de la Km para la F6P. La sobreexpresión de un mutante fosfomimético de *Pfkfb3* en una línea celular de riñón produjo un aumento de los niveles de F26BP y de lactato, favoreciendo la proliferación y demostrando la importancia funcional de este residuo (Bando *et al.*, 2005). En numerosas investigaciones se ha demostrado que es diana de numerosas quinasas, entre las que se incluyen la AMPK (Marsin *et al.*, 2002; Doménech *et al.*, 2015) y las MAPK (del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Novellademunt *et al.*, 2012, 2013). Las proteínas quinasa C (PKC) y A (PKA), también fosforilan a la PFK2 en la serina 461, pero parecen tener más importancia en la fosforilación de otros residuos, y especialmente en otras isoformas distintas de la PFKFB3 (Okamura y Sakakibara, 1998; Ros y Schulze, 2013).

Con respecto a la AMPK, investigaciones de nuestro laboratorio han revelado que existe una activación de la glucólisis, derivada de la inhibición de la respiración por óxido nítrico en astrocitos. El mecanismo subyacente implica el aumento de AMP por depleción energética, conduciendo a la activación de la AMPK e hiperactivación de la PFKFB3 por fosforilación. Esta activación no se observó en neuronas, a pesar de que sí poseen AMPK, probablemente para priorizar otras rutas metabólicas más beneficiosas para ellas, como la PPP (Almeida *et al.*, 2001; Almeida, Moncada y Bolaños, 2004).



Esquema 5. Regulación transcripcional y postraduccional de la PFKFB3. Observamos las diferentes vías responsables de la regulación de la PFKFB3; tanto transcripcionales como postraduccionales. Para más información recurrir al texto. P: Fosforilación, G: Glutacionilación, Ac: Acetilación, M: Metilación.

Adicionalmente a la fosforilación, se han observado otras modificaciones postraduccionales, como la acetilación. La acetilación de la lisina 472 altera la señal de localización nuclear y conduce a la acumulación de PFKFB3 en el citosol. De este modo, la PFKFB3 puede ser regulada por su localización dentro de la célula. Una acumulación de la enzima en el citoplasma la hace más accesible a ser fosforilada por diferentes quinasas como la AMPK, así como a sufrir otras modificaciones (Li *et al.*, 2018). Además, esta acetilación favorece su estabilización en el citosol, al impedir su degradación por APC/C-Cdh1 en el núcleo. PFKFB3, a diferencia de otras isoformas como la PFKFB4, puede encontrarse también en el núcleo. Esta localización sugiere roles adicionales más allá de la modulación de la glucólisis. De hecho, la producción de F26BP en núcleo no parece aumentar directamente la glucólisis, sino que impulsa la proliferación celular. Dada la alta expresión de PFKFB3 en muchos tumores, es plausible que esta enzima

desempeñe un papel crucial en el crecimiento desenfrenado de las células tumorales. La F26BP, a través de su interacción con quinasas dependientes de ciclina (Cdk), puede desencadenar una serie de eventos que conlleven a una proliferación celular acelerada. Esta interacción provoca alteraciones en la regulación normal del ciclo celular (Yalcin *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2022). Se ha observado también que la PFKFB3 puede ser regulada por metilación, una modificación que la protege de otras como la poliubiquitinación y, por tanto, de su degradación. Se observó que en células cancerosas, una metilación reducida aumentaba la degradación de la PFKFB3, contribuyendo al aumento de la PPP (Yamamoto *et al.*, 2014).

Por otro lado, un aumento de glutatión oxidado (GSSG), como consecuencia del incremento sustancial de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), puede conducir a la S-glutationilación, afectando a la función catalítica de la PFKFB3. Esta modificación disminuye su capacidad para sintetizar F26BP, redirigiéndose el uso de la glucosa a través de la PPP (Seo y Lee, 2014).

La PFK2, junto con otras quinasas que la fosforilan, pueden también activarse transcripcionalmente en respuesta a hipoxia o a estrés, contribuyendo a la respuesta protectora frente en estas condiciones. En este contexto, destaca el papel de HIF-1, un factor de transcripción heterodimérico formado por las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β . La subunidad HIF-1 α se degrada en normoxia por la vía ubiquitina-proteasoma, pero en condiciones hipóxicas se estabiliza. De este modo, el complejo HIF-1 α / HIF-1 β reconoce el motivo HRE (del inglés, *Hypoxia Response Element*) y se activa la expresión transcripcional de varios genes relacionados con la captación de glucosa y la glucólisis, entre ellos la hexoquinasa, la LDH y la PFKFB3 (Marsin *et al.*, 2002; Minchenko, Opentanova y Caro, 2003). En línea con esto, en respuesta al daño en el ADN (Ácido Desoxirribonucleico), p53 reduce la expresión de la *Pfkfb3* para mejorar la reparación del ADN y la supervivencia celular (Franklin *et al.*, 2016). El aumento de PPP contribuye a la producción de nucleótidos, necesarios para la reparación del ADN y a la defensa antioxidante, asegurando la supervivencia celular.

Utilización diferencial de la glucosa entre astrocitos y neuronas

Como hemos comentado anteriormente, neuronas y astrocitos emplean de forma distinta la glucosa extracelular, y este fenotipo metabólico diferencial se debe en gran parte a los niveles de PFKFB3 (Herrero-Mendez *et al.*, 2009). Las neuronas redirigen mayoritariamente la glucosa por la PPP en detrimento de la glucólisis. El mantenimiento de unos niveles adecuados de PPP

en neuronas es esencial, ya que esta vía cataliza la descarboxilación oxidativa de la G6P, conservando su potencial redox en forma de NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducido), además de ser una fuente central para la síntesis celular de nucleótidos. El NADPH, empleado por la glutatión reductasa, regenera el glutatión (GSH, la forma reducida), un antioxidante esencial en mamíferos para mantener el equilibrio redox y proteger frente al estrés oxidativo. Algunas moléculas de esta ruta pueden intercambiarse con intermediarios glucolíticos, como es el caso de la F6P y el GA3P sintetizados en la fase no oxidativa de la PPP. No obstante, en células como las neuronas, esta derivación parece ser menos común. Dado que las neuronas poseen una concentración baja de GSH, son más propensas al estrés oxidativo. Sin embargo, esta susceptibilidad se contrarresta con una elevada actividad de la PPP, enfocada en regenerar el GSH (Bolaños y Almeida, 2010; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012). Esta adaptación metabólica es crucial para el equilibrio redox y la protección contra el estrés oxidativo en el cerebro.

Por el contrario, los mayores niveles de PFKFB3 en astrocitos contribuyen a su fuerte fenotipo glucolítico. A partir de la glucólisis se va a generar una gran cantidad de piruvato que, en su mayor parte, se dirigirá a lactato. Este lactato puede desempeñar diversas funciones, entre ellas la de combustible energético para las neuronas, respaldando el modelo de la ANLS.

Modulación espaciotemporal de la glucólisis

El metabolismo cerebral es heterogéneo, tanto espacialmente si hablamos de las diferentes áreas y regiones del Sistema Nervioso, como temporalmente, desde el punto de vista del desarrollo y el envejecimiento. Por tanto, es esperable que la vía glucolítica, cuya importancia a nivel cerebral se ha descrito anteriormente, esté sujeta a cambios espaciotemporales para adaptarse a las circunstancias y a las funciones que sustenta.

Durante el desarrollo temprano de mamíferos, ya se observan picos de glucólisis en momentos clave. Se ha observado que los progenitores en E8.5 (antes del cierre del tubo neural) del prosencéfalo, estructura que da lugar a los hemisferios cerebrales, al tálamo y al hipotálamo, muestran un incremento de la glucólisis y de la dependencia de la disponibilidad de glucosa extracelular. En cambio, los progenitores en E10.5 (después del cierre del tubo neural) son más dependientes de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Fame *et al.*, 2019). Parece, por tanto, que a E8.5 se activa la maquinaria transcripcional en respuesta a hipoxia que desencadena el aumento de la expresión de varias enzimas glucolíticas, entre las que se encuentra la PFKFB3.

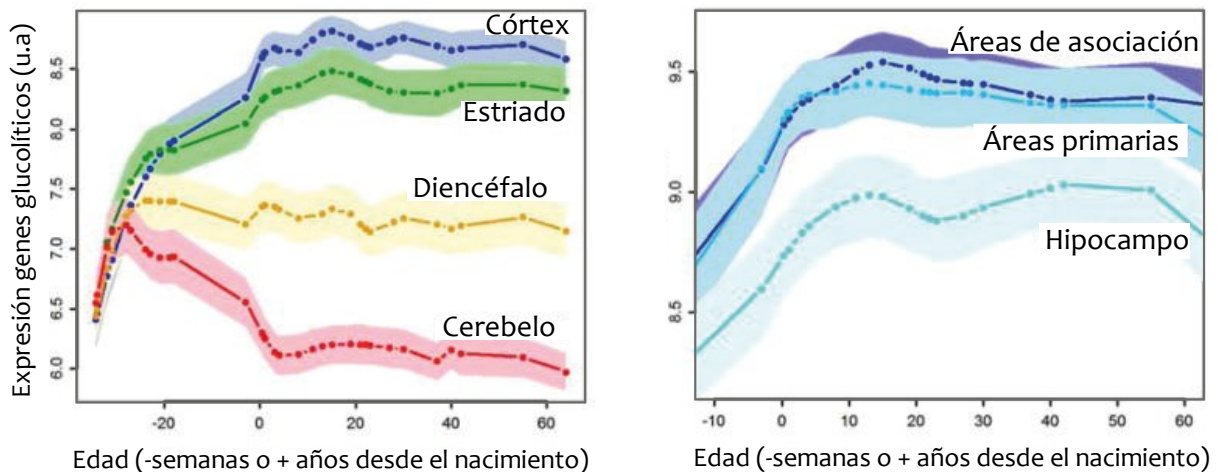
A partir de entonces, los genes glucolíticos se expresan en la placa neural, inducidos por hipoxia en embriones de ratón. Se cree que la glucólisis es esencial para generar la energía local necesaria para el plegado y proliferación celular en la neurulación y, a partir de ahí, el metabolismo de la glucosa se redirige gradualmente hacia el TCA y a la Cadena de Transporte de Electrones (CTE) en función de las concentraciones ambientales de oxígeno (Sakai *et al.*, 2023). Estos cambios no son exclusivos del tejido cerebral ya que también se han observado en placenta durante los mismos días del desarrollo embrionario (Miyazawa *et al.*, 2017). Durante la infancia, el consumo de glucosa en el cerebro aumenta significativamente, y alcanza su punto máximo alrededor de los 5 años. Los estudios que asocian los cambios relativos del consumo de glucosa con respecto al de oxígeno en el flujo sanguíneo cerebral, interpretan que los procesos mitocondriales oxidativos van tomando más protagonismo con la edad adulta (Goyal *et al.*, 2014).

Recientemente, se ha demostrado que la regulación del metabolismo de la glucosa en el hipocampo juvenil difiere ostensiblemente de la de los adultos, ya que en los jóvenes se observa un incremento del metabolismo de la glucosa, disminución de la glucogenogénesis y cambios en los transportadores de glucosa de endotelio y astrocitos. Paralelamente se confirma que las ratas juveniles requieren una tasa más alta de consumo de lactato en el hipocampo para el mantenimiento de la memoria a largo plazo, probablemente derivado de la glucogenolisis. Conjuntamente, se detectan mayores niveles de PFKFB3 en el hipocampo de las ratas jóvenes en comparación con las adultas, y estos niveles aumentaron durante la formación de la memoria solo en las juveniles. Esto demuestra una regulación diferencial de la glucólisis durante la consolidación de la memoria según la edad (Cruz *et al.*, 2022).

Estos resultados están en consonancia con la observación general de que el cerebro sufre una disminución gradual de la utilización de la glucosa y, en términos generales, de la energía, durante el envejecimiento. Aunque este detrimento no es exclusivo de la glucólisis, ya que también se asocia con fenómenos de disfunción mitocondrial (Mosconi, Pupi y De Leon, 2008), parece que esta ruta metabólica es una de las más afectadas. Los cambios metabólicos no son iguales en todas las regiones cerebrales y, posiblemente, las más dependientes de la glucólisis durante la juventud sean las más vulnerables a los problemas asociados con el envejecimiento (Goyal *et al.*, 2017).

Mediante la evaluación de más de un centenar de genes glucolíticos que se identifican como

característicos de regiones cerebrales concretas, se observa que este colectivo génico comienza a variar espacialmente tras el nacimiento. En cerebelo, la expresión de estos genes se reduce significativamente. Sin embargo, en regiones como la corteza, se incrementa la expresión génica drásticamente (**Esquema 6**), principalmente en las áreas de asociación, encargadas de integrar y analizar la información recibida por otras áreas, para llevar a cabo funciones cognitivas superiores (Goyal *et al.*, 2014).



Esquema 6. Variación de la expresión de genes glucolíticos en diferentes regiones cerebrales asociada con la edad. Durante los primeros meses de vida fetal, la expresión de genes glucolíticos aumenta en todas las regiones. Hacia la mitad de la gestación, disminuye en el cerebelo y se mantiene estable en el diencéfalo, mientras que continúa aumentando en el estriado y en la corteza cerebral. Dentro de la corteza cerebral, estos genes se expresan más en las áreas de asociación (imagen tomada y adaptada de Goyal *et al.* 2014).

Por supuesto, los cambios a nivel de la glucólisis asociados con la edad no son independientes del resto de rutas metabólicas. En hipocampo de ratones adultos se ha observado una disminución con la edad de las enzimas de la primera fase de la glucólisis, que consume ATP, y un aumento de las de la fase productora de energía. Estos cambios se acompañan de una reducción de metabolitos de la PPP, la cual puede deberse a un mayor consumo de intermediarios de esta vía para contribuir a la defensa antioxidante, mediante la generación de NADPH, o bien deberse a alteraciones en la propia ruta. Asimismo, se observa una regulación positiva del metabolismo de los ácidos grasos, el cual podría estar contribuyendo a la generación de poder reductor para la protección contra el estrés oxidativo característico del envejecimiento (Dong y Brewer, 2019).

En línea con los cambios fisiológicos asociados con la edad, existen diversas patologías que cursan con alteraciones metabólicas similares. Es el caso de la enfermedad de Alzheimer, en la que la alteración de la vía glucolítica puede desempeñar un papel importante en el desarrollo

de la enfermedad (Fu *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2021; Goyal *et al.*, 2023). En relación directa con la PFKFB3, se ha observado que la inhibición de su actividad conduce a la acumulación de la proteína amiloide β en cultivos de astrocitos procedentes de embriones humanos (Fu *et al.*, 2015). A diferencia de las neuronas, los astrocitos son células mucho más resistentes al daño causado por la proteína amiloide β , por lo que se les atribuye un posible papel protector, junto con la microglía, frente a la enfermedad de Alzheimer (Garwood *et al.*, 2011).

3. Integración del metabolismo en el Sistema Nervioso

El cerebro, que representa aproximadamente un 2 % del peso corporal, es el órgano con mayor demanda energética del organismo. De todos los procesos realizados por el cerebro, las sinapsis, particularmente las eléctricas, son las que requieren un mayor gasto energético. Debido a la gran heterogeneidad celular dentro de este órgano, van a coexistir diferentes rutas metabólicas interconectadas que desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis celular y tisular (Bélanger, Allaman y Magistretti, 2011; Harris, Jolivet y Attwell, 2012; Mergenthaler *et al.*, 2013; Bolaños, 2016; Rose *et al.*, 2020). En este contexto, los astrocitos desempeñan un papel clave para la plasticidad metabólica necesaria para una correcta funcionalidad cerebral (Magistretti, 2006; Linnerbauer, Wheeler y Quintana, 2020).

Estas células gliales presentan una morfología característica, con una extensa ramificación radial. Esta morfología, junto con su distribución espacial cercana a la vasculatura cerebral, les confiere una situación privilegiada para recibir sustratos metabólicos, así como responder a determinados estímulos neurovasculares. Por ejemplo, pueden responder al óxido nítrico, lo cual inhibe su respiración mitocondrial y potencia la glucólisis aeróbica (Almeida, Moncada y Bolaños, 2004). Esta morfología les permite además sobresalir físicamente en la hendidura sináptica. Los procesos astrocíticos están íntimamente involucrados con las sinapsis, comprendiendo lo que se conoce como *sinapsis tripartita*, conformada por las neuronas pre y postsináptica y los pies de los astrocitos. Esta característica los convierte en células idóneas para intercambiar metabolitos, contribuyendo a la arquitectura y a la operatividad sináptica (Perea, Navarrete y Araque, 2009). Una manifestación de su importancia a este nivel es la presencia de una amplia gama de receptores y transportadores de neurotransmisores (Murat y García-Cáceres, 2021).

Por tanto, existe una interacción compleja entre los astrocitos y las neuronas que es

fundamental para el acoplamiento bioenergético y para el correcto funcionamiento del cerebro.

Acoplamiento del metabolismo glucídico entre astrocitos y neuronas

La lanzadera de lactato astrocito-neurona o ANLS

Basándose en el paradigma original de la glucólisis aeróbica, es decir, cuyo producto final era el lactato, se sostiene que el consumo de glucosa va acompañado de un consumo de oxígeno en una proporción de 1 a 6. En 1988, Fox y su equipo observaron un consumo de oxígeno mínimo en comparación con el de glucosa, por lo que concluyeron que las necesidades energéticas del tejido neural activado son mínimas y se satisfacen únicamente a través de la vía glucolítica (Fox *et al.*, 1988). Sin embargo, la utilización oxidativa del lactato por el tejido neural activado podría explicar la discrepancia entre el consumo de glucosa y oxígeno. El mismo año, se publicó otro estudio con cortes de cerebro que muestra que la función de este tejido podía ser sustentada exclusivamente por el lactato como sustrato energético (Schurr, West y Rigor, 1988). A lo largo de los años y de nuevas investigaciones, la visión dogmática de que todas las células cerebrales absorben glucosa seguida de una fosforilación oxidativa completa ha progresado para apoyar la teoría de que existe una cooperación entre las células gliales y las neuronales, dirigida por una compartimentación metabólica y física entre ambos tipos de células.

La primera evidencia directa de esta compartimentación proviene de estudios sobre el modelo de retina de la abeja, donde los compartimentos neuronal y glial son morfológicamente distintos y están organizados de una manera ordenada y fácilmente identificable. En él, los elementos gliales absorben la mayor parte de la glucosa, mientras que los elementos neuronales absorben la mayor parte del oxígeno. Durante los períodos de mayor actividad impuesta por la luz intermitente en la retina, aumenta la captación de glucosa de la glía, al igual que el consumo neuronal de oxígeno. Surge así un modelo vinculante entre glía y neuronas, aunque no a través de lactato sino de alanina obtenida mediante la transaminación del piruvato (Tsacopoulos *et al.*, 1994).

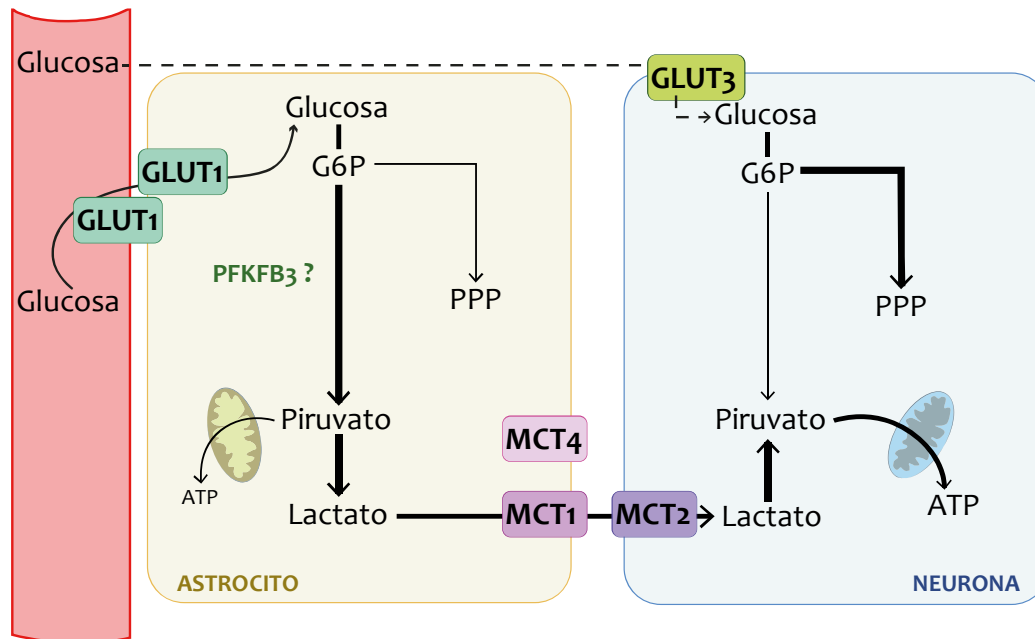
Un estudio contemporáneo adaptó el esquema del metabolismo energético al cerebro de los mamíferos, generando una gran controversia en el campo. En experimentos con cultivos de astrocitos de ratón, se propuso que la activación neuronal desencadena la liberación de glutamato sináptico. Este es absorbido por los astrocitos a través transportadores de

glutamato dependientes de sodio, lo que conduce a un aumento de sodio citosólico que activa la bomba Na^+/K^+ ATPasa, aumentando así el consumo de ATP y activando la glucólisis (Magistretti y Chatton, 2005). A través de esta vía, la glucosa que ingresa a los astrocitos se convierte en lactato, proporcionando ATP para el equilibrio iónico y permitiendo que el lactato fuese utilizado por las neuronas para su metabolismo oxidativo (Pellerin y Magistretti, 1994). A través del lactato, las neuronas consiguen una mayor eficiencia de producción de ATP para garantizar los elevados requerimientos energéticos durante la neurotransmisión. Más tarde, estudios con *Drosophila* mostraron que las células gliales secretan alanina y lactato hacia las neuronas, y que una disminución en la glucólisis glial conduce a la neurodegeneración y a la disminución de la supervivencia (Volkenhoff *et al.*, 2015). Estas observaciones apoyan una conservación evolutiva de la ANLS.

Un sustento a este modelo es la distribución diferencial de las distintas isoformas de LDH y MCT que hemos comentado anteriormente entre neuronas y astrocitos, con una expresión preferencial en neuronas, de las variantes que favorecen la captación del lactato y su posterior conversión a piruvato (**Esquema 7**). Adicionalmente, se han sugerido mecanismos alternativos del transporte de lactato desde los astrocitos, como a través de panexinas y conexinas, o mediante un canal iónico desconocido dependiente de potasio, que permiten un transporte activo de lactato incluso contra un gradiente de concentración química durante una mayor actividad neuronal (Sotelo-Hitschfeld *et al.*, 2015; Karagiannis *et al.*, 2016).

No obstante, existen ciertas controversias que sitúan a la ANLS como foco de debate en la comunidad científica. Aunque hay un creciente número de investigaciones que respaldan esta idea, también emergen argumentos contrarios que cuestionan su aceptación generalizada. En primer lugar, hay un debate sobre la preferencia neuronal de la glucosa sobre el lactato, una idea rebatida en varias publicaciones. Un estudio, mediante el monitoreo por microdiálisis de la utilización de glucosa o lactato marcados con ^{14}C en ratas en movimiento libre, muestra que los astrocitos metabolizan aproximadamente un 50% del lactato intersticial y un 35 % de glucosa; el resto estaría siendo consumido por las neuronas (Ronald Zielke *et al.*, 2007). Sin embargo, las estimaciones se basan en porcentajes de disminución de estos metabolitos tras el uso de un inhibidor de aconitasa a dosis bajas, que teóricamente afectaría principalmente a las células gliales y no a las neuronas. Además, es posible que no solo los astrocitos estén siendo inhibidos ya que con este inhibidor del TCA, el metabolismo puede verse afectado de diversas maneras, lo que añade complejidad y posibles ambigüedades a la interpretación de

los resultados del estudio. Por otro lado, tampoco se tienen en cuenta el resto de las células gliales.



Esquema 7. Lanzadera de lactato astrocito-neurona (ANLS). Se muestra un esquema simplificado del modelo de la ANLS, por la cual los astrocitos, que tienen una alta tasa glucolítica en parte sustentada por altos niveles de PFKFB3, derivan gran parte del lactato procedente del piruvato hacia las neuronas circundantes. Las neuronas, a su vez, toman ese lactato y lo utilizan como fuente de energía.

Otro estudio plantea que el metabolismo de la glucosa aumenta en neuronas glutamatérgicas de cerebelo durante la neurotransmisión, mientras que el del lactato no lo hace. Se discute que, durante la despolarización neuronal, el aumento de calcio intracelular reduce la reoxidación del NADH, desencadenando un aumento de la producción de lactato. En la repolarización, con niveles bajos de calcio, se promueve la formación de piruvato a partir del lactato (Patel *et al.*, 2014). Por tanto, se defiende el uso preferente de la glucosa para la despolarización, y el del lactato durante la fase de reposo. Hay que tener en cuenta que el tejido cerebelar difiere considerablemente de otras regiones del cerebro, comenzando por la cantidad de astrocitos que es mucho menor en esta región.

Mediante imágenes de dos fotones de un análogo de 2-desoxiglucosa (2DG) en el infrarrojo cercano, se ha observado que las neuronas absorben preferentemente la glucosa en ratones despiertos. La estimulación sensorial de los bigotes se asoció con un fuerte aumento en la captación neuronal, pero no astrocítica, del análogo de la 2DG. Estas observaciones proponen a la neurona como el responsable principal de la captación de glucosa (Lundgaard, Li, Xie, Kang, Sanggaard, Haswell, *et al.*, 2015). Además de las controversias en el uso de análogos de

glucosa, que pueden afectar al metabolismo, los experimentos se realizaron bajo condiciones de ayuno, lo que puede favorecer el consumo de glucosa por parte de las neuronas. No obstante, estos resultados apoyan el consumo preferente neuronal de glucosa, al menos en determinadas circunstancias. Sin embargo, otro estudio que investigaba la misma región cerebral en rata obtuvo resultados diferentes. Mediante el uso de otro análogo de glucosa, el 6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino)-6-deoxyglucose se determinó que, bajo condiciones de reposo, los astrocitos y las neuronas lo captan de forma similar. Durante la estimulación, los astrocitos intensifican su captación por el análogo, mientras que en las neuronas no variaba significativamente (Chuquet *et al.*, 2010). Las diferencias entre ambos estudios (Chuquet *et al.*, 2010; Lundgaard, Li, Xie, Kang, Sanggaard, Haswell, *et al.*, 2015) pueden deberse a que los derivados fluorescentes de glucosa empleados difieren significativamente en estructura y tamaño con respecto a la glucosa, por lo que podrían ser captados diferencialmente dependiendo de los transportadores de glucosa presentes en ambos tipos celulares (Díaz-García *et al.*, 2017).

Mediante un abordaje diferente, se observó por espectrofotometría acoplada a resonancia magnética nuclear de carbono-13 un incremento de los niveles de glutamato marcado cuando se empleaba ^{13}C -lactato en comparación con ^{13}C -glucosa. Este resultado indica una preferencia de las neuronas por el lactato para su metabolismo oxidativo (Bouzier-Sore *et al.*, 2006)

Por otro lado, en muestras de hipocampo en reposo se ha observado que la relación NADH:NAD⁺ citosólica es significativamente mayor en astrocitos en comparación con neuronas. Estas demostraciones coinciden con la idea de que los astrocitos tienen una producción elevada de lactato, y existe un gradiente redox que promovería la transferencia de este lactato hacia las neuronas (Mongeon, Venkatachalam y Yellen, 2016). No obstante, hay investigadores que defienden que esta situación cambia bajo estimulación. Por ejemplo, un estudio mostró que, incluso al inhibir los MCT o la LDH, eliminando la posibilidad de una transferencia de lactato de astrocitos a neuronas, se producía un incremento del NADH neuronal (Díaz-García *et al.*, 2017). Sin embargo, no sería irrazonable pensar que las neuronas recurran a vías metabólicas alternativas cuando el lactato no puede utilizarse. Así, la capacidad de adaptarse no parece contradecir la hipótesis de que el lactato se utilice bajo condiciones normales de estimulación y, sobre todo, si el bloqueo de su utilización provoca desajustes significativos en el funcionamiento neuronal.

Una parte esencial del modelo original de la ANLS es la implicación del glutamato (Pellerin y Magistretti, 1994). Autores que defienden la revisión de la ANLS, como G. Dienel, utilizan como uno de sus contrargumentos las discrepancias encontradas con respecto al efecto de este neurotransmisor. Mientras que algunos estudios sugieren que la absorción de glutamato por astrocitos induce una estimulación de la glucólisis, otros estudios indican que el glutamato no tiene ningún efecto o incluso causa una bajada del uso de glucosa. Las discrepancias entre los resultados pueden deberse a las condiciones bajo las cuales se cultivan los astrocitos (Dienel y Cruz, 2015).

Otro de los puntos que defiende es la necesidad de demostrar la transferencia del lactato producido en los astrocitos a las neuronas. Una contribución importante a este nivel se realizó al estudiar la dinámica del lactato en el cerebro de ratones empleando el sensor *Laconic* basado en la tecnología FRET (del inglés, *Forster Resonance Energy Transfer*) y la microscopía de alta resolución. Este estudio evidencia un gradiente de lactato desde los astrocitos a las neuronas en ratón despierto, aunque no se demuestra directamente el transporte (Mächler *et al.*, 2016).

Esta demostración se volvió clave en la defensa de la ANLS. No obstante, existen más investigaciones que respaldan este modelo. Varios grupos han mostrado que los astrocitos son capaces de responder ante el potasio extracelular fisiológico, liberado durante la neurotransmisión. Este potasio causa una despolarización astrocítica e ingreso de bicarbonato a través del transportador NBCe1 (del inglés, *Sodium Bicarbonate Cotransporter Electroneutral type 1*). Se produce una alcalinización citosólica que estimula la glucólisis astrocítica y, además, inhibe la respiración mitocondrial, induciendo un efecto Crabtree agudo. Se cree que la inhibición del consumo de oxígeno se debe a efectos directos sobre los complejos mitocondriales, por ejemplo, una inhibición por los cambios en pH, pero no se descartan mecanismos paralelos. De este modo, las neuronas podrían estar influyendo sobre los astrocitos vecinos para aumentar la disponibilidad de oxígeno y optimizar su propio metabolismo (Fernández-Moncada *et al.*, 2018; Juaristi *et al.*, 2019).

La actividad neuronal también influye el metabolismo astrocítico mediante la inducción de genes relacionados con el transporte y metabolismo de glucosa y lactato. Además, se ha observado que esta influencia disminuye con la edad en humanos, lo que podría contribuir al deterioro cognitivo (Hasel *et al.*, 2017).

Los astrocitos presentan numerosos receptores que les permiten responder a un gran número de moléculas señalizadoras. Gran parte de estos son GPCR (Receptores Metabotrópicos Acoplados a Proteínas G), algunos de los cuales son sensibles al lactato. Se han observado otros, aún desconocidos, que también pueden ser activados por lactato y por otros agonistas, que están acoplados a la producción de AMP cíclico y actúan sobre varias enzimas de la glucólisis, favoreciendo la producción de lactato (Vardjan *et al.*, 2018). Esto contrasta con la observación de una retroalimentación negativa por parte del lactato que limita el uso de glucosa en astrocitos, y que es más fuerte bajo una estimulación con potasio (Sotelo-Hitschfeld, Fernández-Moncada y Barros, 2012). Los mecanismos imperantes no están claros, pero podría tratarse de una inhibición de la PFK1, como se ha observado *in vitro* (Costa Leite *et al.*, 2007). Esto sugiere que el lactato astrocítico podría ayudar a desviar la glucosa a zonas de sinapsis activas, una vez ha actuado como suministro energético. Las diferencias pueden deberse al tipo de estimulación, tiempos y concentraciones de lactato, sugiriendo la existencia de una regulación exhaustiva de este metabolito.

Otro papel no directamente metabólico del lactato se ha descubierto recientemente, y describe que puede actuar como regulador epigenético de histonas y, por tanto, afectar a la transcripción genética (D. Zhang *et al.*, 2019).

Como prueba funcional de la importancia de la ANLS, varios trabajos han demostrado que es especialmente importante cuando las demandas de energía son altas, como durante la formación y consolidación de la memoria. Por ejemplo, se ha visto que la glucogenólisis astrocítica y el transporte de lactato son esenciales para la memoria a largo plazo y la potenciación sináptica. Se ha observado que deficiencias de los transportadores MCT1 y 4 de astrocitos y MCT2 de neuronas cursan con alteraciones en la memoria. Estas alteraciones pueden rescatarse con lactato solamente cuando son los transportadores MCT de astrocitos los que se ven afectados, pero no en el caso del MCT1 neuronal, apoyando la existencia de un transporte de lactato astrocito-neurona (Suzuki *et al.*, 2011; Netzahualcoyotzi y Pellerin, 2020). Otro estudio determinó que la memoria episódica necesita un rápido aporte energético a las neuronas, optando principalmente por la glucogenólisis y el transporte de lactato de astrocitos a las neuronas. Las neuronas utilizan el lactato para generar energía que participa en los procesos de plasticidad, como el aumento de la expresión génica o directamente generando cambios estructurales (Descalzi *et al.*, 2019). En ratones sometidos a estrés, se ha observado una reducción del transporte de glucosa y lactato en los astrocitos del hipocampo

y la corteza, afectando la potenciación a largo plazo. Este bloqueo energético astrocítico se consigue restaurar mediante el suministro de lactato a los astrocitos (Murphy-Royal *et al.*, 2020). Otra alteración funcional observada, fue la contribución de un descenso de lactato, causado por la reducción de la LDH astrocítica, a la aparición de comportamientos depresivos. Se observó que el lactato podría influir en la función de los canales BK, que están implicados en la excitabilidad neuronal (Yao *et al.*, 2023).

Existen, por tanto, importantes estudios que avalan el acoplamiento bioenergético astrocito-neurona, respaldando la ANLS. No obstante, este modelo no va en contra de un uso esencial de la glucosa por parte de las neuronas, ya que ambos mecanismos pueden coexistir dentro del Sistema Nervioso. Además, hay que tener en cuenta que el uso de la glucosa en neuronas es crucial para mantener su homeostasis redox y su supervivencia, como se comentó anteriormente (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012).

Naturalmente, es plausible que el aprovechamiento de la glucosa o del lactato por parte de las neuronas varíe según la región cerebral específica, la edad, o determinadas condiciones patológicas. Dicha coexistencia metabólica puede incluso ocurrir de manera compartimentada. Esta idea cobra especial relevancia en células que presentan morfologías tan diversificadas y diferenciadas, considerando las marcadas diferencias entre axones, procesos dendríticos y somas celulares. Una evidencia de esta compartimentación metabólica neuronal es la localización preferente de enzimas glucolíticas y transportadores GLUT en las proximidades sinápticas (Jang *et al.*, 2016; Ashrafi *et al.*, 2017), lo cual sugiere la posibilidad de un metabolismo localizado de la glucosa, que no impide el aprovechamiento del lactato en otras regiones neuronales. La amplia gama de posibilidades se deriva también de la notable heterogeneidad presente en el cerebro. Esta diversidad no solo se manifiesta en los tipos de neuronas tradicionalmente identificados, sino también en los astrocitos, cuya variabilidad y complejidad se han ido descubriendo con el paso de los años.

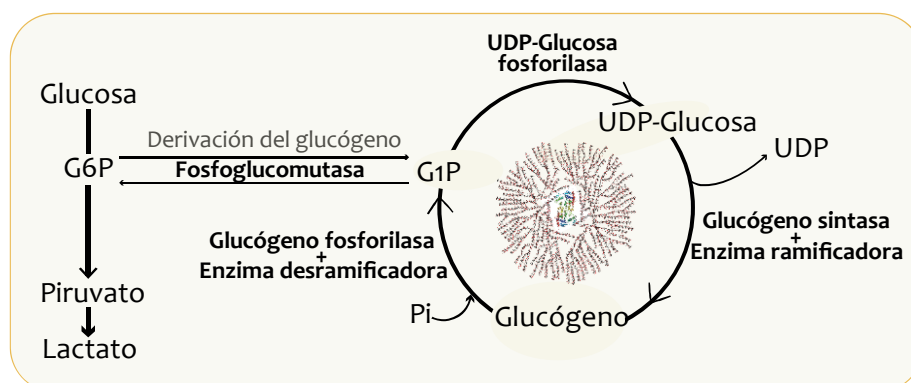
En resumen, todos estos hallazgos sugieren que hay una inesperada complejidad en cómo se produce, se transporta y se utiliza el lactato dentro del tejido cerebral. Un nivel más de complejidad se adquiere cuando se añade un participante más en esta lanzadera, como es el glucógeno.

El glucógeno, más allá de un reservorio de glucosa

El glucógeno, aunque está presente en el cerebro de los mamíferos, se almacena en

concentraciones muy bajas, siendo poco probable que actúe como reserva de energía de un modo convencional. No obstante, investigaciones previas han revelado que el glucógeno cerebral ejerce un papel fundamental en el soporte de las neuronas. En neuronas cocultivadas con astrocitos se ha demostrado que el contenido de glucógeno de estos es esencial para el mantenimiento de la adecuada función neuronal (Swanson y Choi, 1993). Asimismo, se ha observado que está regulado por neurotransmisores y otros compuestos, lo que sugiere su importancia en la respuesta a demandas metabólicas cambiantes, permitiendo su ajuste según las necesidades fisiológicas cerebrales (Magistretti *et al.*, 1994; Sorg *et al.*, 1995). El glutamato es uno de estos neurotransmisores, y es precisamente en esos estudios donde surgió la idea de la ANLS (Pellerin y Magistretti, 1994).

La síntesis de glucógeno o glucogenogénesis requiere la acción coordinada de varias enzimas. A partir de la G6P se va a formar glucosa-1P, que se convertirá en UDP-glucosa (glucosa unida a uridina fosfato), donante inmediato para la síntesis, es decir, implicando un gasto energético en forma de UDP (**Esquema 8**).



Esquema 8. Síntesis y degradación del glucógeno. Se muestra el proceso de síntesis y degradación del glucógeno, incluyendo las enzimas implicadas en él. La derivación del glucógeno hace referencia a la fracción de las moléculas de glucosa captada que pasan por el glucógeno antes de reingresar a la vía glucolítica.

Aunque las neuronas tienen un metabolismo activo del glucógeno, este se encuentra predominantemente almacenado en los astrocitos. La limitación en la producción de glucógeno en las neuronas se debe, al menos en parte, al mantenimiento de un estado constitutivamente inactivo de la glucógeno sintasa, mediante su hiperfosforilación por la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y su posterior degradación proteasomal mediada por el complejo malina-laforina (Vilchez *et al.*, 2007). En cambio, en astrocitos la síntesis se regula positivamente mediante la desfosforilación tanto de la glucógeno sintasa, activándola, como de la glucógeno fosforilasa, inactivándola. La proteína dirigida a glucógeno (PTG) es uno de los

reguladores de estos procesos de desfosforilación, y sus niveles fluctúan en función de diferentes estímulos, como la adrenalina (Ruchti *et al.*, 2016).

El lactato derivado del glucógeno astrocítico mantiene la función neuronal en ausencia de glucosa en preparaciones de nervio óptico de ratas durante varios minutos, lo que indica también su importancia como reserva energética (Brown *et al.*, 2005). Esta asociación entre la degradación de glucógeno y la producción de lactato estrechan la relación entre la glucogenolisis y la glucolisis. Se habla de una *derivación del glucógeno* (*glycogen shunt* en inglés), por la que una fracción de las moléculas de glucosa metabolizadas pasan por el glucógeno antes de reingresar a la vía glucolítica. De este modo, manteniendo unos niveles de glucógeno regulados, existe un suministro constante de G6P procedente de glucógeno hacia la glucolisis, que se hace más sustancial ante determinados estímulos. Además, se observa una supercompensación glucolítica, es decir, un aumento de esta ruta, al inhibir la derivación del glucógeno (Walls *et al.*, 2009; Jakobsen *et al.*, 2017), lo cual estrecha aún más la relación entre ambos procesos metabólicos.

Independientemente de la importancia o no de esta derivación, hay claras evidencias de la importancia del glucógeno a nivel funcional. Como se reflejó en el apartado de la ANLS, la degradación del glucógeno astrocítico unida a la liberación de lactato son esenciales para la formación de la memoria a largo plazo (Suzuki *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016).

En el estudio comparativo entre ratas jóvenes y adultas, se comprobó que el glucógeno astrocítico es esencial para la formación de memoria a largo plazo en adultas, pero no en juveniles, las cuales presentaron una disminución en la producción de glucógeno. La menor dependencia del glucógeno en juveniles se explica, al menos en parte, a una mayor presencia de PFKFB3 en las neuronas, que mantienen los niveles de glucolisis más elevados que en adulto (Cruz *et al.*, 2022).

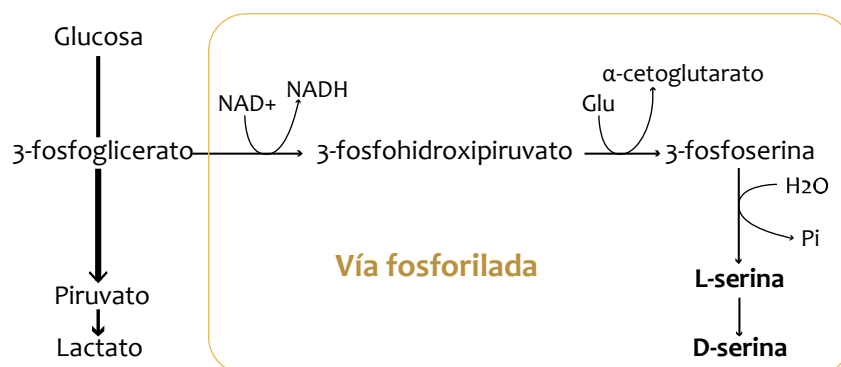
No obstante, la importancia del glucógeno no se restringe a astrocitos. Se ha demostrado que la imposibilidad de producir glucógeno tanto en neuronas como en astrocitos, en ratones modificados genéticamente, cursa con problemas de aprendizaje y memoria, confirmando la importancia fisiológica en ambos tipos celulares (Duran *et al.*, 2020). Esta relevancia se hace muy evidente en la conocida enfermedad de Lafora, donde encontramos una acumulación aberrante de glucógeno tanto en astrocitos como en neuronas, causada por defectos en el complejo malina/laforina. Los pacientes afectados cursan con ataques epilépticos, problemas

musculares y una evidente alteración cognitiva (Vilchez *et al.*, 2007; Rubio-Villena *et al.*, 2018; Duran *et al.*, 2021).

Intermediarios de la glucólisis – La serina

Además de ser la principal ruta para la obtención de lactato, la glucólisis también contribuye al acoplamiento metabólico celular directamente a través de alguno de sus intermediarios.

A este nivel destaca especialmente la serina. Desde el 3-fosfoglicerato se puede formar L-serina, un aminoácido no esencial que se forma principalmente en las células gliales, principalmente en astrocitos (Maugard *et al.*, 2021). La fracción de 3-fosfoglicerato redirigida hacia la síntesis de serina sigue siendo desconocida en el cerebro. La ruta responsable de su síntesis se conoce como *Vía Fosforilada*, e implica gasto de NAD y liberación de fosfatos libres, así como la donación del grupo amino por parte del glutamato (**Esquema 9**).



Esquema 9. Síntesis de serina por la Vía Fosforilada. Se muestran las reacciones para la síntesis de D-serina a partir de 3-fosfoglicerato, intermediario glucolítico, por la conocida Vía Fosforilada. Glu: Glutamato

La relación entre esta vía y la glucólisis se estrecha aún más a través de la regulación alostérica de PKM2 por la serina (Ye *et al.*, 2012). Cuando los niveles de L-serina son altos, PKM2 se activa, incrementando la glucólisis. Si disminuyen, se afecta el flujo glucolítico, causando una acumulación de intermediarios glucolíticos como 3-fosfoglicerato o 2-fosfoglicerato, favoreciendo la síntesis de L-serina. Aunque la serina está presente en el plasma, la síntesis *de novo* es importante, particularmente en el cerebro, donde su captación está limitada por su deficiente entrada a través de la barrera hematoencefálica (Yang y Vousden, 2016). Su síntesis puede estar regulada por la ratio NAD/NADH. Una disminución de NAD, como se mostró anteriormente, puede conducir a la reducción de la síntesis de serina (Broeks *et al.*, 2023).

La L-serina es un precursor fundamental para la síntesis de D-serina. En términos generales, está aceptada la producción astrocítica de L-serina, pero existe un debate sobre el lugar en

donde esta se racemiza a D-serina. Si se produce en el astrocito, se puede liberar como gliotransmisor. En cambio, la L-serina podría transportarse a la neurona y ahí convertirse en D-serina. Por tanto, es probable que exista una lanzadera de L-serina entre los astrocitos y las neuronas para su síntesis, liberación y degradación, pero aún es necesaria su caracterización (Maugard *et al.*, 2021). Asimismo, la L-serina es precursora de la glicina que, junto con la D-serina, son coagonistas del receptor de glutamato NMDA. Estas dos moléculas son clave en la regulación de la transmisión glutamatérgica excitatoria. Además, la glicina también actúa como un neurotransmisor inhibitor a través de receptores ionotrópicos en ciertas regiones neuronales (Henneberger *et al.*, 2010; Maugard *et al.*, 2021) y, de forma general, también se utiliza en la síntesis de purinas y timidilatos y en reacciones de metilación.

Por otro lado, la serina es precursora de la cisteína, que junto con la glicina van a contribuir a la producción de GSH y NADPH y, de este modo, al mantenimiento del estado redox (Yang y Vousden, 2016). Asimismo, la serina funciona como un grupo principal cuando se suministra directamente a la biosíntesis de fosfatidilserina. Es especialmente importante en el cerebro porque parece desempeñar un papel crítico en la sinapsis (Kim, Huang y Spector, 2014). Recientemente, se ha publicado un estudio que muestra que la reducción de L- y D-serina en el hipocampo de un modelo murino de Alzheimer afecta negativamente a la ruta glucolítica. Además, demuestra cómo la suplementación con L-serina consigue rescatar los déficits sinápticos y de comportamiento (Le Douce *et al.*, 2020).

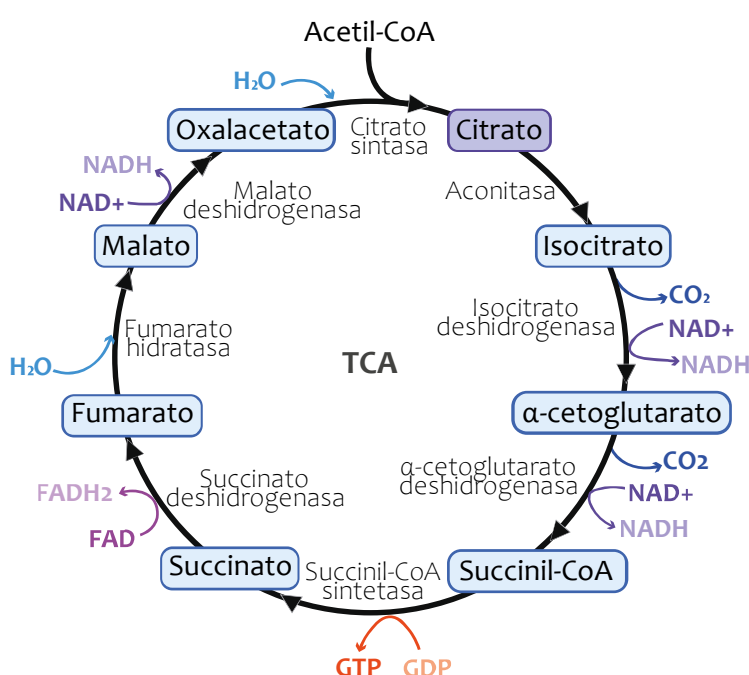
Acoplamiento del metabolismo oxidativo diferencial entre astrocitos y neuronas

Metabolismo del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA)

Dentro de la mitocondria, el acetil-CoA puede entrar en el TCA, un ciclo que desempeña un papel crucial para la producción de energía celular, al alimentar la CTE. Por cada molécula de acetil-CoA, en una vuelta completa del ciclo genera 1 molécula de GTP (guanosina trifosfato), 1 de FADH₂ (flavina adenina dinucleótido reducido) y 3 de NADH (**Esquema 10**).

Además, sus intermediarios participan en procesos de reposición o anaplerosis, fundamentales para mantener el correcto funcionamiento del ciclo. Esta reposición parece ser más lenta en los astrocitos en comparación con las neuronas (Bouzier-Sore *et al.* 2006), a pesar de que estas no poseen ciertas enzimas clave necesarias para la anaplerosis, como la piruvato carboxilasa y la glutamina sintetasa. Estas enzimas, sin embargo, están presentes en los astrocitos. La piruvato carboxilasa cataliza la transformación del piruvato a oxalacetato, el cual,

a diferencia del acetil-CoA, se incorpora directamente en el ciclo TCA (Schousboe, Waagepetersen y Sonnewald, 2019). Por otro lado, la glutamina sintetasa se encarga de convertir el glutamato en glutamina. Debido a la ausencia de estas enzimas en neuronas, es esencial el intercambio de metabolitos, como la glutamina y el lactato, entre estas y los astrocitos, para garantizar la síntesis de neurotransmisores (Öz *et al.*, 2004). El glutamato puede también convertirse en α -cetoglutarato, intermediario del TCA, a través de la glutamato deshidrogenasa. Esta reacción es reversible, por lo que a partir de este ciclo también se puede producir directamente glutamato. La enzima se encuentra en ambos tipos celulares, pero su expresión parece ser mayoritaria en astrocitos (Lovatt *et al.*, 2007).



Esquema 10. Reacciones del Ciclo de Krebs o Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos. Se representan las reacciones del TCA, incluyendo los metabolitos intermedios, cofactores y enzimas implicadas.

Además de generar glutamato, el TCA provee precursores para la producción de otros aminoácidos esenciales para la formación de neurotransmisores como el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y la acetilcolina. El intermediario citrato es producido tanto en neuronas como en astrocitos, pero estos exportan mucho más que las neuronas (Sonnewald *et al.*, 1991). Este puede funcionar como quelante de iones zinc, afectando a la excitabilidad neuronal al regular la actividad del receptor de NMDA (Schousboe *et al.*, 1997). Por otro lado, puede transportarse al citosol en forma de oxalacetato, favoreciendo la producción de colesterol y lactato, que pueden transferirse a las neuronas (Natarajaseenivasan *et al.*, 2022).

Una alternativa al uso de oxalacetato en el citosol es la gluconeogénesis. Aunque el astrocito

es predominantemente un consumidor de glucosa, presenta las herramientas para sintetizar glucosa *de novo* a partir de precursores no glucídicos. Sin embargo, se desconoce si los astrocitos pueden actuar de intermediarios en el transporte de glucosa desde la sangre hacia las neuronas. A pesar de que cuentan con glucosa-6-fosfatasa, lo que les permite desfosforilar la G6P procedente de la glucogenolisis a glucosa libre, aún no se ha confirmado de manera definitiva la posibilidad de transportar esta glucosa hacia otros tipos celulares como las neuronas (Souza *et al.*, 2019).

Cadena de transporte de electrones (CTE) y fosforilación oxidativa

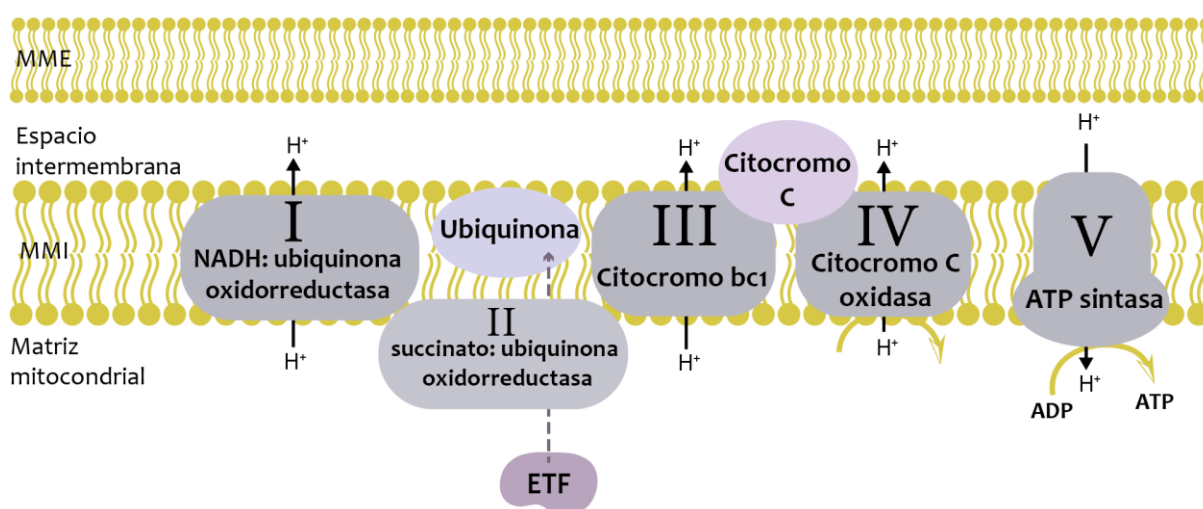
El poder reductor generado en el TCA y en otras vías metabólicas se puede emplear para la generación de energía, concretamente a nivel de la CTE mitocondrial, principal consumidor de oxígeno en las células. A medida que los electrones se mueven a través de la cadena, se bombean protones hacia el espacio intermembrana, generando un gradiente que es utilizado por la ATP sintasa para impulsar la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa. Bajo ciertas condiciones, la ATP sintasa (complejo V) puede funcionar en sentido reverso para hidrolizar el ATP. De esta forma los protones se extruyen hacia el espacio intermembrana, y así se mantiene el gradiente electroquímico necesario para conseguir un buen funcionamiento mitocondrial (Garedeu, Henderson y Moncada, 2010).

La CTE está compuesta por cuatro complejos (I-IV), el coenzima Q (conocida como ubiquinona en su forma oxidada y ubiquinol en su forma reducida) y el citocromo C. En el **Esquema 11** se observa la distribución de los complejos I al IV de la CTE y la ATP sintasa a lo largo de la membrana mitocondrial interna, donde se muestra también el nombre específico que recibe cada uno de estos complejos, así como los puntos de bombeo de protones.

La función principal del ubiquinol es actuar como portador de electrones al complejo III, que a su vez los transfiere al complejo IV a través del citocromo C, donde se combinan con oxígeno y protones, produciendo agua (Vercellino y Sazanov, 2022). La dependencia del consumo de oxígeno por la actividad de los complejos de la CTE convierte a la mitocondria en la principal fuente de producción de ROS (Murphy 2009).

Numerosas enzimas intervienen en reacciones redox para mantener activa la CTE. Las deshidrogenasas altamente energéticas, como la PDH y las del ciclo de Krebs, generan NADH que alimenta el complejo I (Hernández-Camacho *et al.*, 2021). Otras deshidrogenasas utilizan FAD como cofactor, transfiriendo electrones a la ubiquinona sin afectar al gradiente de

protones, como la succinato deshidrogenasa y enzimas del metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos. La flavoproteína de transferencia de electrones oxidorreductasa juega un papel clave, aceptando electrones de 14 enzimas conocidas, como las deshidrogenasas de acil-CoA que participan en la β -oxidación. Se ha demostrado que la flavoproteína de transferencia de electrones es una de las proteínas involucradas en la generación activa de ROS (Henriques *et al.*, 2021). La glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial también utiliza FAD y, junto con la lanzadera malato-aspartato, ayuda a mantener la relación NAD/NADH en la célula. Aunque esta lanzadera se ha considerado irrelevante en el cerebro, investigaciones recientes destacan su expresión en neuronas y su posible rol en memoria y aprendizaje (Martano *et al.*, 2016).



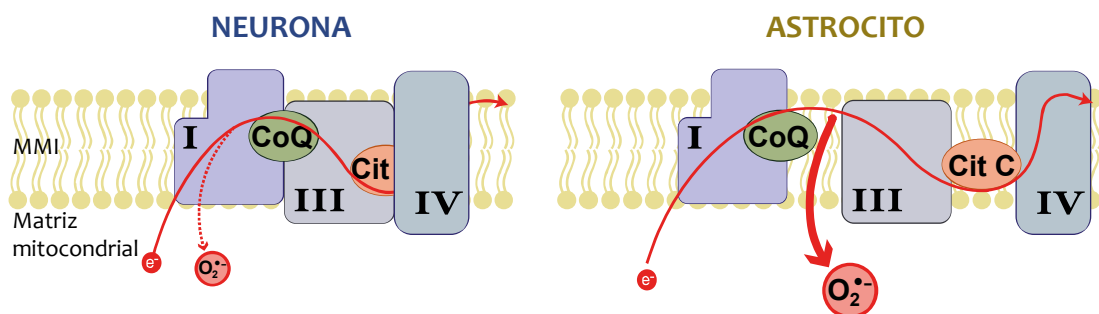
Esquema 11. Representación de los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTE). La CTE mitocondrial simplificada, formada por los cinco complejos (I-V), el Coenzima Q, el Citocromo C, y la flavoproteína de transferencia de electrones (ETF). El bombeo de protones de los complejos I, III y IV crea un gradiente electroquímico, aprovechado por la ATP sintasa para producir ATP por fosforilación oxidativa.

El conocimiento de la distribución de los componentes de la CTE en la mitocondria ha evolucionado, pasando de una visión lineal a estructuras supramoleculares dinámicas. La membrana mitocondrial interna forma crestas mitocondriales cuya morfología se relaciona con procesos como el envejecimiento y la apoptosis (Heath-Engel y Shore, 2006). La microscopía ha revelado que los complejos generadores de gradientes de protones se ubican en la superficie plana de estas crestas, mientras que los dímeros de ATPasa se alinean en sus bordes, optimizando su eficiencia. Recientes descubrimientos indican que la ATPasa puede reubicarse, sugiriendo un nivel adicional de regulación en la organización y función mitocondrial (Weissert *et al.*, 2021).

La primera propuesta de la existencia de superestructuras formadas por varios complejos de la CTE se elaboró hace más de 20 años y se denominaron supercomplejos (SC). En ese estudio

se describe el respirasoma, formado por unidades de los complejos I, III y IV (Schägger, Hermann and Pfeiffer, 2000). Se ha observado que la formación de estos SC aumenta la eficiencia de la fosforilación oxidativa. Los SC pueden variar en composición, apuntando hacia la flexibilidad en su configuración (Novack *et al.*, 2020). Sin embargo, los mecanismos precisos de su formación y regulación aún no son del todo conocidos. Algunos factores de ensamblaje, como SCAFI, han demostrado ser importantes para la interacción entre complejos, y las diferencias en la expresión de estos factores pueden variar entre especies y tipos celulares (Lapuente-Brun *et al.*, 2013).

A nivel cerebral, trabajos de nuestro laboratorio han destacado la relevancia de la subunidad NDUFS1 del módulo N del complejo I en la formación de SC, particularmente en neuronas, donde su alta expresión favorece la asociación del complejo I al complejo III en SC, reduciendo la producción de ROS sin alterar el consumo de oxígeno. Por el contrario, los astrocitos muestran niveles más altos de ROS debido a un mayor porcentaje de complejo I libre que no forma SC (Lopez-Fabuel *et al.*, 2016) (**Esquema 12**).



Esquema 12. Asociación diferencial de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en neuronas y astrocitos. Se observa un mayor grado de ensamblaje entre complejos I-III en las neuronas en comparación con los astrocitos, lo que determina su menor producción de ROS. MMI: membrana mitocondrial interna.

Diferentes estudios han demostrado que la formación de SC es un proceso dinámico y que influye en la regulación del flujo de electrones para optimizar el uso de sustratos disponibles. En nuestro laboratorio, se ha demostrado que una reducción del consumo de ácidos grasos en los astrocitos conduce a un aumento de la formación de supercomplejos, con la consecuente disminución de ROS, provocando alteraciones funcionales de las neuronas en ratón (Morant-Ferrando *et al.*, 2023). No obstante, la importancia de los supercomplejos en patología es objeto de debate, dado que los ratones carentes de SCAFI mantuvieron su capacidad de fosforilación oxidativa sin presentar signos patológicos (Milenkovic *et al.*, 2023), lo que refuerza la importancia de estas superestructuras en la regulación de funciones a nivel fisiológico.

Comunicación por ROS

Las neuronas mantienen unos niveles relativamente bajos de ROS, si bien estos pueden incrementarse durante la neurotransmisión. Aunque las neuronas presentan una defensa antioxidante limitada en comparación con la de los astrocitos, están protegidas contra el daño oxidativo a través de diferentes mecanismos. En primer lugar, disponen de mecanismos intrínsecos como la metabolización mayoritaria de glucosa por la vía de la PPP, que permite regenerar el GSH a expensas de los niveles de NADPH (Herrero-Mendez *et al.*, 2009; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012). En segundo lugar, el superensamblaje de los complejos mitocondriales de la CTE, que posibilita reducir la producción de ROS (Lopez-Fabuel *et al.*, 2016). En tercer lugar, los astrocitos vecinos también pueden actuar como equilibradores redox protegiendo a las neuronas del daño oxidativo. En este punto es clave la vía de Nrf2. En nuestro laboratorio, se ha identificado que ambos tipos celulares presentan distintos niveles de actividad de esta vía antioxidante (Jiménez-Blasco *et al.*, 2015). En las neuronas, el factor de transcripción Nrf2 se desestabiliza constantemente, lo que conduce a la represión de genes antioxidantes. Sin embargo, los astrocitos presentan muy reducida la maquinaria de degradación de Nrf2, presentando niveles aproximadamente 1000 veces superiores de este factor de transcripción, respaldando así su función antioxidante. Durante la neurotransmisión glutamatérgica se activan los receptores NMDA astrocíticos, lo que desencadena una cascada de señalización mediada por calcio y PKC, que culmina con la fosforilación de Nrf2. Esta modificación postraduccional promueve su traslocación al núcleo, donde puede desencadenar la activación de una batería de genes antioxidantes (Jiménez-Blasco *et al.*, 2015). De este modo, los astrocitos pueden sintetizar los precursores para la biosíntesis del glutatión y enviarlos hacia las neuronas (Dringen, Pfeiffer y Hamprecht, 1999). Estas, lo regeneran usando NADPH, obtenido tras redirigir el consumo de la glucosa a través de la PPP. Así, niveles significativamente reducidos de ROS astrocíticos van a afectar directamente a la funcionabilidad neuronal (Vicente-Gutierrez *et al.*, 2019). Esta interacción entre neuronas y astrocitos es esencial para mantener la homeostasis redox y vincular la neurotransmisión con la supervivencia neuronal.

La producción y funcionalidad de las ROS mitocondriales en astrocitos son fundamentales para el correcto funcionamiento celular, pero muestran una naturaleza dual dependiendo del entorno metabólico. Por ejemplo, en condiciones de hipoxia fisiológica, se ha observado que los astrocitos aumentan su producción de ROS, lo que sugiere un mecanismo de respuesta

adaptativa a los niveles bajos de oxígeno. Sin embargo, un exceso de ROS puede ser perjudicial, como ocurre en algunas enfermedades neurodegenerativas como el Párkinson (Jiménez-Blasco, Almeida y Bolaños, 2023).

Acoplamiento del metabolismo lipídico entre astrocitos y neuronas

Oxidación de ácidos grasos y transferencia de cuerpos cetónicos

Otra vía esencial para la obtención de energía es la β -oxidación de ácidos grasos. Además, los de cadena impar van a producir propionil-CoA, que puede contribuir a la anaplerosis del TCA a través de su conversión a succinato (Rose *et al.*, 2020). A pesar de la creencia previa de que el cerebro no empleaba ácidos grasos como fuente de energía, actualmente, se estima que estos podrían constituir alrededor del 20% del consumo energético del cerebro (Ebert, Haller y Walton, 2003).

Recientemente se ha revelado que, cuando la ruta glucolítica en *Drosophila* se ve comprometida en células gliales, la oxidación de ácidos grasos se torna esencial para el mantenimiento de la supervivencia (McMullen *et al.*, 2023). En ratones, un estudio paralelo realizado por nuestro laboratorio demuestra que el consumo mitocondrial de los ácidos grasos contribuye al mantenimiento de una elevada producción fisiológica de ROS, cuyos efectos señaladores son imprescindibles para preservar un rendimiento cognitivo y conductual adecuado (Morant-Ferrando *et al.*, 2023).

Particularmente en los astrocitos, aproximadamente un 70 % del acetil-CoA derivado de ácidos grasos se convierte en cuerpos cetónicos en lugar de entrar en el TCA (Blázquez *et al.*, 1998). Su consumo se vuelve imprescindible cuando los niveles de glucosa son bajos, como durante el ayuno prolongado o la cetosis. Mientras que los principales productores de cuerpos cetónicos son los astrocitos, estos poseen una menor capacidad para oxidarlos y obtener energía de ellos. En cambio, las neuronas, y otros tipos celulares como los oligodendrocitos, son los principales consumidores (Edmond *et al.*, 1987; Panov *et al.*, 2014). La señalización inducida por niveles elevados de AMP cíclico en los astrocitos, típica durante el ayuno pero no exclusiva de este, es un estímulo importante para la síntesis local de cuerpos cetónicos (Schönfeld y Reiser, 2017). Estos cuerpos cetónicos se transportan a través del MCT1 astrocítico y, posteriormente, el MCT2 los incorpora a las neuronas, donde se metabolizan en las mitocondrias para producir ATP.

Más allá de los procesos derivados de la oxidación de los ácidos grasos, los astrocitos también pueden enviar ácidos grasos directamente para el consumo neuronal. Un ejemplo es el colesterol, sintetizado principalmente por los astrocitos e incorporado por las neuronas para mantener una correcta composición y fluidez de sus membranas (Nieweg, Schaller y Pfrieger, 2009). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que los productos lipídicos neuronales no utilizados u oxidados, pueden ser transportados a los astrocitos donde se almacenan en gotas lipídicas antes de su metabolización en las mitocondrias, reduciendo la toxicidad de los ácidos grasos en el citosol (Ioannou *et al.*, 2019). Este es un sistema de protección neuronal por parte de los astrocitos ya que son capaces de eliminar componentes tóxicos o dañinos para estas, pero existen otros mecanismos, como comentaremos brevemente en el siguiente apartado.

Otros componentes de la interacción astrocito-neurona

Dentro de una célula, otros procesos que ayudan a mantener un buen funcionamiento metabólico son los mecanismos de degradación. Dentro de estos mecanismos, la autofagia (macroautofagia) desempeña un papel crucial en la regulación de diversos procesos biológicos, incluyendo la neuroprotección y las respuestas al estrés celular.

Recambio de componentes celulares – Autofagia

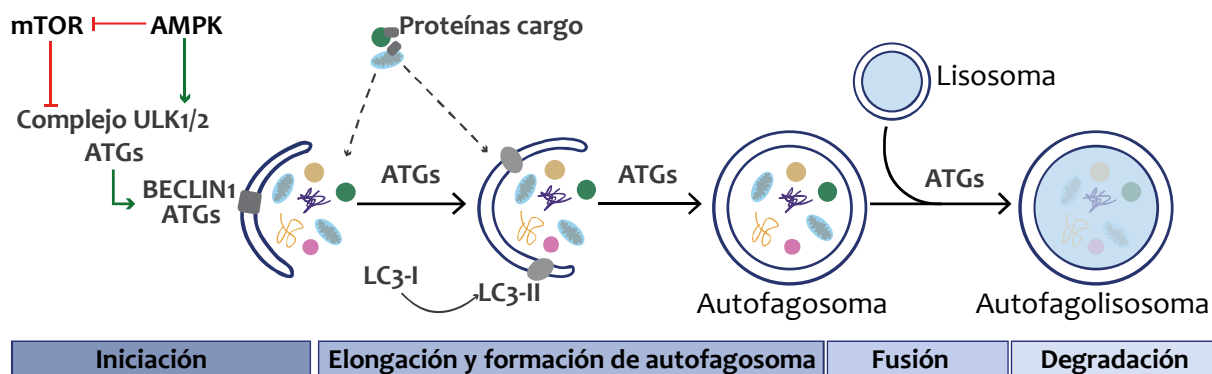
Es un mecanismo dependiente de los lisosomas que elimina y recicla componentes celulares dañados o innecesarios y actúa como un sistema de control de calidad fundamental en la fisiología y la patología de las células neurales (Wang *et al.*, 2019).

La autofagia es un proceso extendido a muchos tipos celulares y, por supuesto, también a nivel cerebral. Existen evidencias de que la autofagia basal es esencial para mantener un recambio constante de proteínas intracelulares y prevenir la neurodegeneración (Sung y Jimenez-Sanchez, 2020). Respecto a las neuronas, la desactivación de genes específicos centrales de autofagia causa disfunción neuronal (Kulkarni *et al.*, 2020). Se ha relacionado también la autofagia con los procesos de aprendizaje y memoria, y se ha observado que una disminución de la autofagia en el hipocampo tiene un impacto negativo en la función cognitiva (Glatigny *et al.*, 2019). Además, en algunos estudios se ha observado una relación directa de la PFKFB3 con la autofagia (Klarer *et al.*, 2014; Yang, Goronzy y Weyand, 2014), que aún permanece en debate.

Una regulación positiva de la autofagia puede modular los niveles de α -sinucleína en los astrocitos, atenuando la toxicidad (Kulkarni *et al.*, 2020). Se ha observado que la autofagia puede modular la dinámica mitocondrial en astrocitos durante inflamación, causando fragmentación mitocondrial y alteraciones en la cadena respiratoria astrocítica (Sung y Jimenez-Sanchez, 2020). Esta activación de la autofagia tiene un papel crucial, ya que permite que las mitocondrias fragmentadas y dañadas sean fagocitadas por los autofagosomas. La acumulación excesiva de mitocondrias disfuncionales puede conllevar a un aumento de ROS y afectar a la viabilidad celular (Motori *et al.*, 2013). Se cree que los astrocitos podrían internalizar mitocondrias dañadas de las neuronas y este proceso podría estar incrementado en algunas patologías como en Alzheimer (Davis *et al.*, 2014).

La vía de la autofagia está altamente regulada y responde a diversas señales y condiciones celulares. La principal forma de regulación es la activación por ausencia en la disponibilidad de nutrientes (Ortiz-Rodriguez y Arevalo, 2020) siendo más pronunciada en astrocitos que en neuronas (Kulkarni *et al.*, 2020). En condiciones normales, ULK1/2, una de las principales proteínas de iniciación, se mantiene mayoritariamente inhibido, lo que implica unos niveles bajos de autofagia. Existe una activación basal, que difiere según el tipo celular. La proteína mTOR (del inglés *mammalian Target of Rapamycin*) actúa como inhibidor de la autofagia al regular negativamente ULK1/2 (**Esquema 13**). En cambio, AMPK, activada por déficits energéticos, promueve la autofagia. Consecuentemente, se activa el complejo Beclin-1, que induce la formación de inositol 3-fosfato, esencial para los autofagosomas. AMPK regula positivamente la autofagia a través de la inhibición de mTOR y directamente activando la formación de los complejos Beclin-1 y ULK1/2 mediante fosforilación. La quinasa mTOR puede ser, a su vez, activada por la vía de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (PKB o Akt), que se activa principalmente por neurotrofinas y factores de crecimiento (Manning y Cantley, 2007).

El proceso completo de la autofagia se divide en varias fases, y todas ellas están reguladas por diferentes ATG (del inglés, *AuTophagy-related Gene*), que forman complejos específicos con otras proteínas, diferentes según el lugar de actuación. Una proteína clave es LC3 que, tras lipidarse, se une a las membranas autofagosómicas, facilitando la interacción con los receptores de carga específicos, que marcan las proteínas para su degradación. Finalmente, estos autofagosomas se fusionan con los lisosomas, que contienen la maquinaria necesaria para degradar el material celular dañado o innecesario (Feng *et al.*, 2014).



Esquema 13. Representación simplificada de la ruta autofágica. Representación del proceso de autofagia. La ruta autofágica es inhibida por mTOR y activada por AMPK, a través de la activación del Complejo ULK1/2 que, junto con proteínas ATG van a inducir a Beclin1 y otras ATG para iniciar el proceso. Posteriormente, los productos marcados para su degradación mediante proteínas cargo (como p62) se dirigen al endosoma en formación. Se produce la elongación y la formación del autofagosoma, donde participa LC3 lipidado (LC3-II), hasta la fusión con el lisosoma que permite la degradación de los productos de desecho. Durante todo el proceso actuarán diferentes complejos de ATG.

En el cerebro, la disfunción de la autofagia favorece la acumulación de proteínas aberrantes y el avance de enfermedades neurodegenerativas. Modulando la autofagia, los astrocitos pueden proteger neuronas tras estímulos dañinos, reduciendo la muerte neuronal y el daño cerebral (Ortiz-Rodriguez y Arevalo, 2020). Esta modulación de los procesos autofágicos es una evidencia más del papel esencial que llevan a cabo los astrocitos en el mantenimiento de la homeostasis y de la función cerebral.

4. Heterogeneidad astrocítica en el cerebro

Los astrocitos son uno de los tipos celulares más abundantes en el sistema nervioso central de los mamíferos y como hemos descrito a lo largo de la introducción participan en una amplia variedad de funciones fisiológicas como son el soporte mecánico, la plasticidad metabólica, la protección antioxidante, la regeneración, el recambio de componentes alterados y la regulación sináptica.

La morfología y función de estas células difieren entre regiones del cerebro y especies. Con el desarrollo de nuevas técnicas y avances, se han encontrado evidencias de que los astrocitos exhiben notables diferencias en su origen durante el desarrollo, su composición molecular y sus efectos funcionales (Lanjakornsiripan *et al.*, 2018; Viana *et al.*, 2023).

Tipos de astrocitos

Históricamente se han definido dos subtipos básicos de astrocitos, los protoplasmáticos y los fibrosos. Los astrocitos protoplasmáticos son los más abundantes, presentan procesos muy ramificados y densos y se encuentran en la sustancia gris. En cambio, los fibrosos son más grandes, sus prolongaciones no son arbóreas sino más rectas y de mayor longitud, y se localizan principalmente en la sustancia blanca. La expresión de GFAP (del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*), un marcador típico de astrocitos se encuentra en ambos tipos, pero está restringida a los pies terminales en los protoplasmáticos, cerca de los vasos sanguíneos, y distribuida de forma más homogénea y abundante en los fibrosos. Existen otros tipos de astrocitos en zonas concretas del cerebro, como es el caso de los astrocitos de la capa 1 de la corteza cerebral de ratones (Tabata, 2015). Estos tres tipos de astrocitos se encuentran distribuidos ampliamente en el cerebro de mamíferos. En el caso de primates, encontramos al menos dos tipos específicos más; ambos expresan GFAP, entre otros marcadores. Son los interlaminares y los de proyección varicosa, relacionados con el procesamiento cognitivo de orden superior (Sosunov *et al.*, 2014).

Los astrocitos maduros muestran una variedad de morfologías. Un estudio sistemático de los astrocitos del hipocampo y del cuerpo estriado de ratón ha revelado que los del cuerpo estriado generalmente ocupan un área más grande que los del hipocampo (Chai *et al.*, 2017). La heterogeneidad morfológica se extiende incluso a los que ocupan la misma región del cerebro. Se ha evidenciado que los astrocitos corticales e hipocampales muestran distintos subtipos morfológicos distribuidos diferencialmente (Lanjakornsiripan *et al.*, 2018; Karpf *et al.*, 2022).

La diversidad en la expresión de marcadores astrocíticos subraya su heterogeneidad funcional. Avances en secuenciación han acelerado significativamente nuestra comprensión de esta variabilidad en los astrocitos (Holt, 2023).

Marcadores específicos de astrocitos

La identificación y caracterización de marcadores específicos de astrocitos se ha convertido en un desafío desde hace décadas. Para entender completamente la función y morfología de los astrocitos, es esencial una combinación de marcadores. Las técnicas actuales de secuenciación de ARN y microscopía avanzada están proporcionando información detallada sobre la

heterogeneidad y diversidad de los astrocitos en diferentes regiones cerebrales.

La GFAP ha sido el marcador más reconocido y utilizado, pero su expresión no es uniforme en todas las regiones ni en todos los tipos de astrocitos. Esto ha llevado a la búsqueda de otros marcadores, como NDRG2 (del inglés *N-myc Downstream-Regulated Gene 2*), S100 β , la conexina 30, los transportadores de glutamato GLAST y GLT-1 y la aldehído deshidrogenasa Aldh1L1, entre otros, que pueden brindar una visión más detallada y específica de la localización y función de los astrocitos en diferentes regiones del cerebro (Z. Zhang *et al.*, 2019; Jurga *et al.*, 2021).

Estudios comparativos entre estos marcadores han revelado que, dependiendo de la región cerebral de interés, uno puede ser más adecuado que otro. Por ejemplo, NDRG2 puede ser más apto para marcar astrocitos en la corteza, S100 β y Aldh1L1 lo son para el tálamo, y GFAP es especialmente útil en el hipocampo y el cuerpo calloso (Koh *et al.*, 2017; Z. Zhang *et al.*, 2019).

Para la caracterización morfológica y potencialmente funcional, es crucial la selección adecuada de marcadores. Al utilizar estos marcadores como promotores específicos, la prioridad no es tanto la alta expresión en el tipo celular de interés, sino la especificidad exclusiva para dicho tipo celular. Es esencial garantizar que no haya expresión en otras células. En este aspecto, la GFAP sigue siendo el promotor escogido por excelencia. Además, el desarrollo de una versión corta mejorada ha aumentado su especificidad de forma considerable (Lee *et al.*, 2008). Su expresión está muy extendida, aunque no en los mismos niveles, a una cantidad considerable de astrocitos, pero no a otros tipos de células neurales. Una excepción la encontramos en las células madre en proliferación, cuya participación puede ser importante en determinados contextos (Z. Zhang *et al.*, 2019). Un marcador emergente aclamado es la Aldh1L1 que ha surgido como un específico de astrocito, aunque en cultivos no siempre marca astrocitos maduros, y su especificidad está en debate (Foo y Dougherty, 2013; Koh *et al.*, 2017). Así, para ciertas aproximaciones metodológicas, es también relevante que el promotor escogido no se exprese en otras células no neurales. La GFAP se expresa adicionalmente en unas células minoritarias del hígado llamadas células estrelladas. Sin embargo, la Aldh1L1 tiene una expresión más extendida, encontrándose también en células hepáticas y células de Schwann (Foo y Dougherty, 2013).

La expresión y regulación de la proteína GFAP son fundamentales en la conocida *reactividad*

astrocítica, un concepto debatido, que es evidenciado por cambios morfológicos y bioquímicos en los astrocitos. Aunque la GFAP se incrementa en diversas patologías del Sistema Nervioso Central y responde a estímulos fisiológicos, su expresión no siempre se alinea con la severidad de la lesión, variando según la región cerebral y la etapa de desarrollo. Esto entra en contraste con la microglía, las células neurales protectoras por excelencia, cuyos patrones de actividad están relativamente más claros y definidos. Esta reactividad, junto con la abundancia de GFAP *per se*, pueden reflejar una plasticidad adaptativa, no solo una respuesta a estímulos patológicos, desafiando la interpretación de su aumento como un marcador absoluto de reactividad o función alterada de los astrocitos (Escartin *et al.*, 2021).

La heterogeneidad astrocítica del cerebro refleja la complejidad y diversidad funcional de estos componentes celulares esenciales. Sin embargo, se presenta como una limitación a la hora de elegir el promotor de interés para la expresión célula-específica de proteínas. A pesar de esta heterogeneidad funcional, la mayor parte de la comunidad científica defiende el papel esencial que desempeña la glucólisis en los astrocitos. La PFKFB3 destaca por su cometido en la regulación de la glucólisis. Su control nos permite modular esta ruta sin afectar directamente a ninguna de sus enzimas principales, previniendo así la interrupción total de la glucólisis o alteraciones abruptas en el metabolismo. Este hecho, junto con su expresión diferencial en astrocitos y neuronas, hacen de esta proteína una diana de estudio sumamente interesante. La posible implicación de la PFKFB3 en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer pone de manifiesto su importancia en la salud cerebral. La glucólisis no solo es una piedra angular en el metabolismo astrocítico, sino que también es crucial para mantener la sinergia entre astrocitos y neuronas. Cualquier desequilibrio en este proceso puede conducir a un desacoplamiento bioenergético entre ambos tipos celulares, afectando la funcionalidad neuronal, lo que puede conducir a alteraciones en las funciones conductuales y cognitivas superiores.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El acoplamiento metabólico entre astrocitos y neuronas es crucial para un adecuado funcionamiento cerebral y, por ende, para las funciones neurales superiores. La importancia de la ruta glucolítica en el Sistema Nervioso es irrefutable. Asimismo, la glucólisis no solo provee de una fuente rápida de energía, sino que también genera metabolitos intermediarios que son claves para garantizar un acoplamiento metabólico cerebral óptimo. A pesar de la notable heterogeneidad encontrada al analizar en detalle las distintas poblaciones de astrocitos, hay un consenso generalizado sobre la relevancia de esta vía glucolítica en estas células gliales.

En trabajos previos del laboratorio se confirma que, a diferencia de las neuronas, los astrocitos derivaban la glucosa mayoritariamente a través de la vía glucolítica en detrimento de la PPP y se demuestra que esta diferencia metabólica entre ambos tipos celulares radica en los mayores niveles de enzima proglucolítica PFKFB3 presentes en los astrocitos, en comparación con las neuronas. Por lo tanto, la PFKFB3 emerge como un objetivo clave de estudio dada su influencia determinante en la modulación del metabolismo cerebral de la glucosa. Paralelamente, teniendo en cuenta las fluctuaciones espaciotemporales en el metabolismo de la glucosa cerebral, especialmente en la glucólisis, se sugiere que su relevancia funcional podría estar adaptada durante el envejecimiento.

En vista a estos antecedentes, se plantea la posibilidad de que la **PFKFB3 en astrocitos pueda desempeñar un papel esencial para el mantenimiento de la función neuronal, asegurando un bienestar conductual y un rendimiento cognitivo adecuados.**

Objetivos

De acuerdo con los precedentes descritos y la hipótesis de trabajo, en esta Tesis Doctoral hemos planteado los siguientes **objetivos generales**:

1. **Desarrollar un modelo experimental capaz de reducir la vía glucolítica en astrocitos, a través de la eliminación selectiva de la enzima proglucolítica 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-3 (PFKFB3).** Se utilizará un modelo condicional de ratón *knockout* del gen endógeno de la *Pfkfb3*, que nos permita eliminar PFKFB3 específicamente en astrocitos, tanto en cultivo como en cerebro de animales adultos jóvenes y maduros.
2. **Evaluar el papel fisiológico de la glucolisis y particularmente de la PFKFB3 en el metabolismo astrocítico.** Se evaluarán las consecuencias metabólicas de la eliminación de la PFKFB3 en cultivo primario de astrocitos.
3. **Analizar la influencia de la eliminación de PFKFB3 en astrocitos de cerebro de ratón adulto joven y adulto maduro, sobre el metabolismo general, la funcionalidad neuronal y el comportamiento.** Se estudiará el comportamiento motor, conductual y cognitivo de los ratones PFKFB3-KO específicos de astrocito. Finalmente, se realizará un análisis de diferentes metabolitos cerebrales, así como del estado funcional y estructural de las neuronas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Trabajo con modelos de ratón modificados genéticamente

Todos los procedimientos con animales se han realizado de acuerdo con la Directiva 86/609/CEE de la Unión Europea y la Recomendación 2007/526/CE, así como la legislación española vigente RD53/2013, del 1 de febrero de 2013, relativas a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas respecto al alojamiento y cuidado de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. Además, los protocolos realizados con animales fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

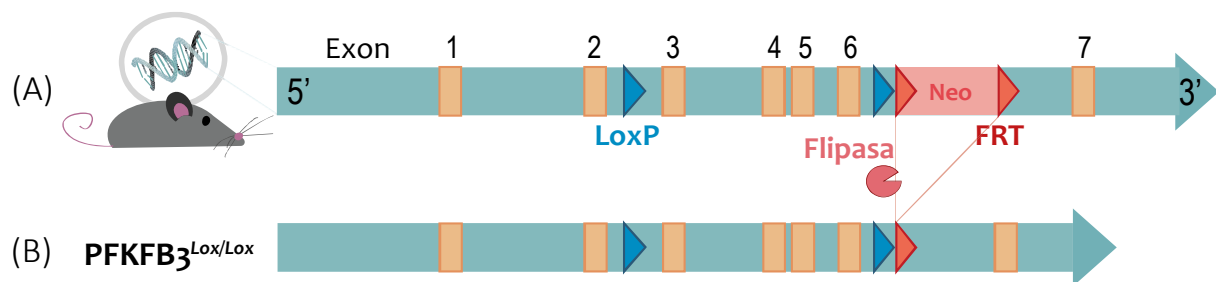
Los animales se criaron en jaulas ventiladas individualmente en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca, en un ciclo no invertido de luz-oscuridad de 12 horas (fase de oscuridad 20:00 a 8:00). La humedad relativa se mantuvo entre 45-65% y la temperatura entre 20-25 °C. Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta sólida estándar (LabDiet® Picolab® Verified-751F) y acceso libre al agua. Las calorías de esta dieta proceden de un 23 % de proteínas, un 13 % de lípidos y un 64 % de carbohidratos, aproximadamente; su composición detallada está disponible *online*.

1.1. Generación del modelo de ratón KO condicional PFKFB3

Con el fin de analizar el metabolismo glucolítico en astrocitos, se generó un modelo animal de ratón en el que se elimina, selectivamente en estas células, parte del gen de la *Pfkfb3* y, en consecuencia, de la proteína PFKFB3, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se trata de un modelo murino *knockout* (KO) condicional de la PFKFB3, en un fondo genético C57BL/6J, cedido amablemente por Peter Carmeliet (Laboratorio de *Angiogenesis and Neurovascular Metabolism*, Centro de investigación Vesalius, Lovaina, Bélgica), que porta la *Pfkfb3* endógena con dos sitios *loxP* flanqueando los exones 2 y 6 (**Esquema I**), introducidos por recombinación homóloga en células madre embrionarias. El vector contenía, de 5' a 3': un flanco de homología 5', otro intermedio con los dos sitios *loxP*, un casete de resistencia a neomicina flanqueado por una secuencia de reconocimiento de flipasa (FRT, del inglés *flipase recognition target*) y un flanco de homología 3'. Los clones se identificaron mediante análisis de transferencia de *Southern* y PCR apropiadas (en el laboratorio de procedencia del modelo).

Los animales quiméricos resultantes se criaron para la transmisión de la línea germinal. Posteriormente, para la eliminación del casete de neomicina, se cruzaron con un modelo murino portador de una flipasa (Jackson), capaz de reconocer los sitios FRT que flanqueaban dicho casete, escindiéndolo. Se realizaron los cruces pertinentes hasta conseguir animales homocigotos para la *Pfkfb3* floxeada y sin la presencia del casete de neomicina ni de la expresión de la flipasa, es decir *Pfkfb3^{lox/lox}*, los cuales se emplearon para todos los experimentos de esta Tesis Doctoral. Durante el desarrollo de los experimentos, tanto en cultivo como *in vivo*, se diseñaron cruces entre estos animales evitando consanguinidad entre los progenitores.



Esquema I. Esquema de la construcción del animal floxeado en el locus génico *Pfkfb3*. La inserción de los sitios *loxP* conllevó la introducción de un casete de Neomicina (A). Una vez eliminado, se obtiene el modelo genético empleado, con los exones 3 y 6 del gen de la PFKFB3 flanqueados por *loxP* (B).

2. Genotipado de ratones

La obtención del modelo KO condicional que se utilizó se basa en la estrategia *CRE-loxP*, de forma que una recombinasa CRE, introducida exógenamente, se pueda unir a las secuencias *loxP*, efectuando los cortes pertinentes y así, la escisión del fragmento génico de interés.

Se necesita la presencia de los sitios *loxP* en ambos alelos del gen de la *Pfkfb3* para que se pueda conseguir la eliminación efectiva de la proteína. Por ello, tanto para la generación del modelo como para las posteriores comprobaciones de control, es necesario el frecuente genotipado de los ratones.

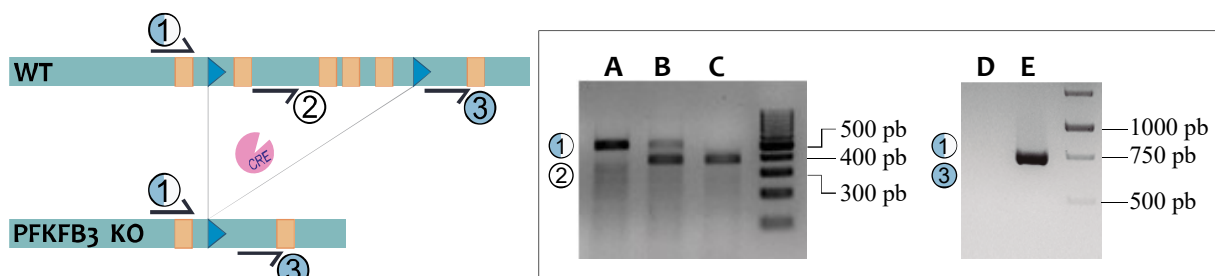
Para ello, se extrajo el ADN de la cola y se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Actualmente, debido a cambios en la normativa del animalario, el material genético se extrae del tejido que sobra del marcaje identificativo de las orejas.

2.1. Extracción de ADN genómico

Se realizó la biopsia de la cola u oreja de cada animal en el momento del destete, aproximadamente a los 20-22 días de vida. Para la digestión del tejido, se añadieron 200 μ l de Tampón TEN suplementando extemporáneamente con 1 mM DTT (ditiotreitól), 0,5 mM de espermidina y 50 μ g/muestra de proteinasa K, y se incubó a 55 °C durante la noche (O.N, del inglés *overnight*). El lisado se inactivó a 100 °C durante 5 minutos para evitar la acción continuada de la proteinasa K. Finalmente, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 16000 *g* para decantar el detrito tisular, y se guardaron a 4 °C.

2.2. Identificación genotípica de los ratones *Pfkfb3*^{Lox/Lox} y de la recombinación

Para la identificación genotípica de los ratones *Pfkfb3*^{lox/lox} se emplearon dos cebadores que flanqueaban uno de los sitios *loxP* de la *Pfkfb3*, cuyas secuencias son 5'-CGAGACAATGTTCCATAGCTTGAATG-3' el directo y 5'-CAGGCCAGACCAAGGACAGC-3' el reverso. Utilizando estos cebadores, se obtuvo un fragmento de cerca de 400 pb para los animales no transgénicos, y una banda de mayor longitud, alrededor de 500 pb, para los animales transgénicos (**Esquema II**). De este modo, un ratón transgénico homocigoto (*Pfkfb3*^{lox/lox}) presentaría una única banda de mayor longitud (**Esquema II-A**), mientras que para un ratón silvestre (WT, del inglés *wild type*) aparecería una banda más corta (**Esquema II-C**). Ambos amplicones estarían presentes en los ratones heterocigotos (**Esquema II-B**).



Esquema II. Genotipado de ratones *Pfkfb3*^{lox/lox} y verificación del evento de recombinación. Se muestra la posición de los cebadores empleados para el genotipado y comprobación de la recombinación, así como de las bandas obtenidas para un homocigoto transgénico (A), un heterocigoto (B) y WT (C), utilizando los cebadores 1 y 2; y la ausencia de recombinación (D) y presencia de este evento (E), con los cebadores 1 y 3.

Mediante esta técnica también se pudo comprobar el evento de recombinación utilizando otro cebador reverso en combinación con el directo empleado para el genotipado, en este caso: 5'-GGCTGTGCTATAGTGTGAGAATCCT-3'. Este hibrida en una región posterior al segundo sitio *loxP*, de forma que el fragmento amplificado es demasiado grande para resolverse en las

condiciones empleadas (**Esquema II-D**). No obstante, tras el evento de recombinación en presencia de la recombinasa CRE, dicho fragmento se redujo a ~700 pb (**Esquema II-E**).

Para cada reacción se preparó una mezcla de: 8 µl de agua libre de nucleasas, 10 µl de tampón EcoTaq 2x, 1 µl del cebador director 10 µM, 1 µl del cebador reverso 10 µM y 1 µl de muestra. La PCR se desarrolló en un termociclador automático Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf), cuyas condiciones fueron: 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72°. Los productos de la PCR se mezclaron con tampón de carga 6X para DNA [ver **apartado 3**] y se resolvieron en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich) al 3 % (p/v) en tampón TAE al que se añadió Midori Green (1:20000; Nippon Genetics Europe GmbH) como agente intercalante. Para diferenciar los tamaños de los diferentes productos de PCR se emplearon los marcadores de peso molecular *Plus ADN ladder* 100 pb y 1 Kb (Thermo Fischer Scientific). Para visualizar las bandas del ADN se utilizó un transiluminador *Gel Doc XR* (Bio-Rad Laboratories) y el software *Quantity One* (Bio-Rad Laboratories).

2.3. Identificación de la ausencia del casete de neomicina y flipasa

Como se comentó, para la generación definitiva del modelo se llevó a cabo una limpieza del casete de neomicina cruzando los animales *Pfkb3^{Lox/Lox}* con un modelo de ratón portador del gen de la flipasa (Jackson Laboratory). Para la comprobación de la presencia o ausencia del casete, se emplearon los cebadores: 5'-GAGCTCAGGTCAGGGATTGGA-3' para el directo y 5'-CCTGAACAGCTGGATGGCCTT-3' para el reverso. Posteriormente, para comprobar que la flipasa se había eliminado, se utilizaron: 5'-CACTGATATTGTAAGTAGTTTGC-3' el directo y 5'-CTAGTGCGAAGTAGTGATCAGG-3', el reverso.

3. Medios y soluciones

A continuación, se detalla la composición de las soluciones y medios empleados para los diferentes protocolos, así como algunas consideraciones a la hora de elaborarlos.

EBSS (Solución Earle's Balanced Salt)

Para la disgregación del tejido, tanto para cultivos como para cerebro adulto, se utilizó Solución Earle's Balanced Salt (EBSS), preparado con NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 1,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ 1,01 mM, glucosa 4 mM, rojo fenol 10 mg/L, pH 7,15.

KRPG (Tampón Krebs-Ringer fosfato)

Para incubar algunos experimentos se utilizó Tampón Krebs-Ringer fosfato (KRPG) pH 7,35; con NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 5,7 mM, KCl 4,86 mM, CaCl₂ 0,54 mM, MgSO₄ 1,22 mM, glucosa 5,5 mM (se preparó sin glucosa para el experimento de depleción de glucosa).

DMEM (Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's)

Para la realización y mantenimiento de los cultivos primarios de astrocitos se empleó el DMEM con referencia (ref.) D5546 (Sigma), que incluye, entre otros componentes, glucosa 5,5 mM y piruvato 1 mM, y se suplementó con glutamina 4 mM. Se denominó DMEM de cultivo. Para el mantenimiento normal de los cultivos se añadió suero fetal bovino (SF) al 10 %, mientras que para la transducción viral se redujo al 0,5 %, para ralentizar la proliferación.

El medio DMEM fue también utilizado para la mayoría de los experimentos, en este caso la ref. D5030 (Sigma) diluida en agua destilada (8,3 g/L) a pH 7,4 suplementada con glutamina 4 mM, piruvato 1 mM, glucosa 5,5 mM y ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES) 5 mM. Se le denominó DMEM de experimentación.

Palmitato conjugado con albúmina de suero bovino

Los ácidos grasos de cadena larga como el palmitato son hidrofóbicos, por lo que es conveniente realizar una conjugación con albúmina de suero bovino (BSA; A7906, Sigma) para solubilizarlos y estabilizarlos, además de ayudar a prevenir su oxidación y degradación. Para ello, el palmitato se disolvió a una concentración final de 4 M en etanol, a 75 °C. Paralelamente, se calentó KRPG con un 0,11 % de BSA a 50 °C. Con estas dos soluciones se prepararon las alícuotas de uso, mediante una dilución 1/100 del palmitato en el KRPG con BSA; se vortexó y calentó a 50 °C durante 20 minutos. Se incubó O.N a 37 °C y se guardó a -20 °C. La concentración final de este stock es de 40 mM de palmitato y 0,1 % BSA.

PBS (Tampón fosfato salino)

Para los distintos lavados celulares se empleó tampón fosfato salino (PBS), que se compone de NaCl 136 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 7,8 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,4. Para los lavados del tejido fijado y de las secciones cerebrales se empleó tampón fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4.

Una variante, que se empleó en el protocolo de disgregación celular y separación magnética, fue D-PBS (*Dulbecco's* PBS), que presenta, además de los compuestos anteriores, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 0,9 mM y BSA al 0,5 % (p/v).

Tampones de carga

Para preparar las muestras para los geles de acrilamida/agarosa, se utilizaron distintos tampones de carga. El empleado para ADN se preparó al 6X, con Tris 100 mM pH 7,6, con azul de bromofenol 0,03 % (p/v), xileno-cianol FF 0,03 % (p/v), 60 % de glicerol (v/v) y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 60 mM.

El de proteínas se preparó 5X, a partir de Tris 250 mM con β -mercaptoetanol 4 % (v/v), dodecilsulfato sódico (SDS) 8 % (p/v), azul de bromofenol 0,02 % (p/v), glicerol 4 % (v/v) y. Para mitocondrias solubilizadas se preparó 10X, a partir de Serva-Blue 0,5 % y ácido 6-aminohexanoico 0,1 M.

Tampones de electroforesis y transferencia

El tampón de electroforesis desnaturizante fue Tampón Tris-Glicina, preparado con Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS 0,1 % (p/v), a pH 8,3. Para la electroforesis en condiciones nativas, se usó una Solución de Cátodo con tricina 50 mM y Bis-Tris/HCl 15 mM, pH 7, y una Solución de Ánodo con Bis-Tris 50 mM pH 7.

La solución de transferencia para condiciones desnaturizantes fue Tampón Tris-Glicina-Metanol, a partir de Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20 % (v/v), a pH 8,3. Para condiciones nativas, se utilizó Tampón de bicarbonato, con NaHCO_3 10 mM y Na_2CO_3 3 mM pH 9,5.

Tampón de extracción de proteínas

Para la extracción proteica de muestras procedentes de cultivo, el tampón base empleado fue RIPA (del inglés, *RadioImmunoPrecipitation Assay buffer*) preparado a partir de: Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, NP-40 1 % (v/v), deoxicolato sódico 0,5 %, SDS 0,1 % (p/v). Esta solución se suplementó con inhibidores de fosfatasas (cóctel ref. P0044 de Sigma, fluoruro de sodio 50 mM y orto-vanadato sódico 1 mM) e inhibidores de proteasas (aprotinina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; leupeptina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; inhibidor de tripsina de la soja 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Tosil-Lisina Clorometilo Cetona (TLCK) 100 μM ; fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 100 μM ; N-p-tosil-L-fenilamina clorometil cetona (TPCK) 100 μM ; fenantrolina 1 mM y pepstatina A 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

En la extracción proteica de muestras procedentes de tejido cerebral, se utilizó una solución que se denominó Tampón de lisis, cuya composición es: tris 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM, Triton X-100 1%, β -glicerofosfato 2 mM,

pirofosfato sódico 5 mM, metavanodato sódico 2 mM, leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 2 µg/ml, PMSF (fluoruro de Fenilmetilsulfonilo) 1 mM.

Para la lisis de las células y la posterior normalización de los datos en algunos experimentos, se utilizó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración de 0,1 M.

Tampones para extracción y solubilización de mitocondrias

Para la extracción de mitocondrias se utilizaron dos tampones iniciales (A, B) para crear el gradiente de sacarosa, un tampón de lavado (C) y una solución final (D) para resuspender y mantener las mitocondrias una vez extraídas. La composición fue la siguiente:

A: sacarosa 83 mM, ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) 10 mM pH 7,2

B: sacarosa 250 mM, MOPS 30 mM, pH 7,2

C: sacarosa 320 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4

D: ácido 6-aminohexanoico 1 M; Bis-Tris/HCl 50 mM; pH 7; suplementado con inhibidores de proteasas (P2714, Sigma) y fosfatasas (ref. P0044, Sigma), ambos en DMSO.

Tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE)

El Tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) se utilizó para preparar los geles de agarosa y el buffer de electroforesis de ADN. Su composición fue 40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA; pH 8,3.

Tampón Tris con Tween (TTBS)

El Tampón Tris con Tween (TTBS) se utilizó para las incubaciones de las membranas en el protocolo de inmunotransferencia tipo *Western Blot*, y se compuso de: Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0,1 % v/v, a pH 7,5.

Tampón TEN (Tris-ácido etilendiaminotetraacético-NaCl)

El tampón TEN se utilizó para la extracción del ADN durante la digestión tisular, y se compuso de Tris 50 mM, EDTA 5 mM y NaCl 100 mM, a pH 7,5.

Solución fijadora

La solución para fijar el tejido cerebral extraído se compuso de paraformaldehído 4 % (p/v) despolimerizado con NaOH y estabilizado con metanol 10 % (v/v), en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4. Para su preparación, se disolvió el paraformaldehído en 1/3 del volumen final de agua entre 60-70 °C en un vaso de precipitados de vidrio. Para la despolimerización se añadió NaOH

hasta que la solución se volvió completamente transparente y se dejó enfriar en hielo. Se añadió el metanol y 1/2 de tampón fosfato 0,2 M. Finalmente, se enrasó y se filtró con papel de filtro.

4. Cultivos celulares

Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en incubadores con una atmósfera húmeda y al 5% de CO₂. El desarrollo del cultivo y la manipulación previa a la realización de los diferentes experimentos u obtención de muestras se llevó a cabo en cabinas de flujo laminar con material estéril. No obstante, el medio de cultivo se suplementó con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml anfotericina B (Sigma), así como con Plasmocín™ (InvivoGen) a concentraciones profilácticas de 2,5 µg/ml, específico para la prevención de micoplasma.

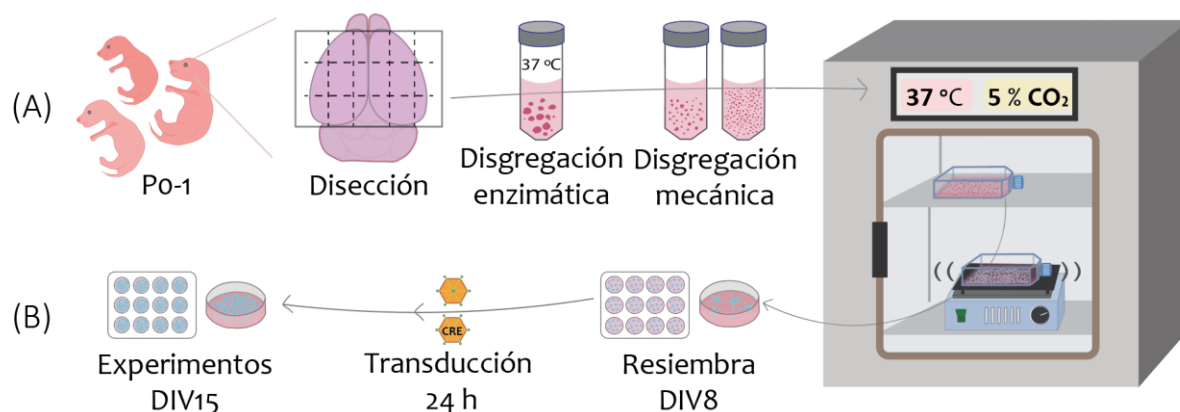
4.1. Cultivo primario de astrocitos corticales del modelo *Pfkb3^{lox/lox}* murino

Los cultivos primarios de astrocitos de ratón se realizaron a partir de neonatos de 0-24 h descendientes de estos cruces. La disgregación y sembrado de las células primarias se realizó según el protocolo previamente descrito (Almeida y Medina 1998) (**Esquema III-A**).

Tras la decapitación, se extrajo el cerebro y se diseccionó la corteza cerebral, descartando el cerebelo, todavía incipiente, y los bulbos olfatorios. Para eliminar las meninges se arrastró suavemente el tejido sobre un papel absorbente, y se fragmentó con un bisturí. Posteriormente, se le añadió una solución de tripsinización, que consistía en EBSS suplementado con BSA 0,3 % (p/v), ADNasa tipo I a 20 µg/ml y tripsina 0,025 % (p/v) a 37 °C en un baño durante 10 minutos agitando reiteradamente. Se empleó un volumen de (n + 1) ml de esta solución, siendo n el número de cerebros extraídos. Para detener la digestión enzimática se añadió un 10 % de SF, y se centrifugó a 600 g durante 5 minutos a temperatura ambiente (RT, del inglés *room temperature*).

El pellet tisular se resuspendió en una solución de disgregación, compuesta por EBSS con BSA 0,3 % (p/v) y ADNasa I 8 µg/ml, y se disgregó mecánicamente mediante el pipeteo con una Pasteur, previamente siliconada y flameada para reducir el efecto cizalla y favorecer la individualización de las células sin dañarlas. Se añadieron 8-10 ml de esta solución y se realizaron 10 pasos por la pipeta. El sobrenadante se recolectó en otro tubo tras la decantación del tejido durante 4 minutos y se repitió el proceso anterior una vez más. La suspensión celular

se centrifugó 5 minutos a 600 g y el pellet celular se sembró en frascos estériles de 175 cm² (Falcon). Se sembraron 3-4 cerebros/frasco, en un volumen de 36 ml/frasco de DMEM de cultivo suplementado con un 10 % de suero fetal (además del antibiótico y antimicótico comentados anteriormente). El medio se reemplazó cada 2-3 días. El día 7 *in vitro* (DIV7), los frascos se agitaron a 150 rpm en un agitador orbital dentro del incubador termostatizado con atmósfera de CO₂ durante al menos 12 h, para enriquecer el porcentaje de astrocitos, eliminando otras células que están más débilmente adheridas (**Esquema III-B**). Tras eliminar el sobrenadante, las células restantes se incubaron con tripsina-EDTA 1X (del stock 10X ref. T4174, Sigma; diluido en PBS), se levantaron y se contaron en una cámara Neubauer y se sembraron en las placas óptimas específicas para cara experimento. La densidad de sembrado fue siempre de 50000 células/cm², con un volumen de medio de aproximadamente 0,25 ml/cm²; excepto para las placas de *Seahorse XF24*, que se sembraron 100000 células/cm² en 0,8 ml/cm². Al día siguiente se realizó la transducción con adenovirus.



Esquema III. Cultivo primario de astrocitos. Tras la diseción y disgregación del cerebro de animales Po-1, se incubaron los astrocitos hasta su agitación (A). Se sembraron en las placas definitivas a DIV8; al día siguiente se transdujeron con adenovirus durante 24 horas y los experimentos se realizaron a DIV15 (B).

4.2. Transducción de cultivo primario de astrocitos con adenovirus

La transducción los astrocitos corticales de ratón se produjo al día siguiente a la resiembra (DIV9), durante 24 horas, en una cabina de bioseguridad tipo II. Para obtener astrocitos PFKFB3 KO, se emplearon adenovirus tipo 5 que expresaban la recombinasa CRE bajo un promotor ubicuo citomegalovirus. La misma construcción, pero sin CRE, se utilizó para los astrocitos control o WT. Se empleó DMEM de cultivo suplementado con un 0,5 % de SF, y se utilizó la mitad de volumen de medio con respecto al de cultivo para mejorar la eficiencia de transducción. Tras 24 horas, se renovó el medio con DMEM de cultivo con 10 % de suero.

La concentración óptima de adenovirus se determinó realizando una titulación previa y comprobando la bajada de la proteína mediante inmunotransferencia tipo *Western Blot* [ver **apartado 9**]. Se optó por 15 genomas virales (gv) por célula. Del mismo modo, se hizo un seguimiento de la proteína a lo largo del tiempo, estableciéndose como día del experimento el sexto tras la infección (DIV15). Entre 20-28 horas antes se renovó el medio de cultivo.

5. Tratamientos específicos de los cultivos celulares

5.1. Tratamiento con cianuro potásico (KCN)

Para algunos experimentos se utilizó cianuro potásico (KCN) que, entre otros efectos, inhibe el complejo IV de la CTE, con la consecuente depleción energética y aumento de la ruta glucolítica. El KCN se pesó y se diluyó extemporáneamente en el propio medio de incubación; los tiempos se indican en cada caso. Se empleó regularmente la concentración de 1 mM para producir ese incremento de la glucólisis sin inhibir completamente la respiración. Esto último se testó con la tecnología *Seahorse*, incluyendo KCN en el puerto A del cartucho y, posteriormente, realizando una medición del consumo de oxígeno [ver **apartado 14**].

5.2. Tratamiento con 1,4-dideoxi-1,4-imino-d-arabinitol (DAB)

Para profundizar en el estudio del uso del glucógeno se realizaron algunos experimentos empleando 1,4-dideoxi-1,4-imino-d-arabinitol (DAB), un inhibidor de la glucógeno fosforilasa. Se realizó una incubación previa con el compuesto de 2 horas, y se mantuvo durante el tiempo que se requirió inhibir la degradación del glucógeno. Siguiendo la bibliografía, las concentraciones empleadas fueron de 300 nM y 1 mM (Walls *et al.*, 2008), a partir del stock diluido en agua.

5.3. Tratamiento con inhibidores de lisosomas (IL)

Para analizar la vía de la autofagia, los astrocitos primarios se incubaron, en medio fresco, en ausencia o presencia de los inhibidores de la proteólisis lisosomal: leupeptina (100 μ M) y cloruro de amonio (20 mM) durante 2 horas (García-Macia *et al.*, 2021).

6. Generación de ratones PFKFB3 KO

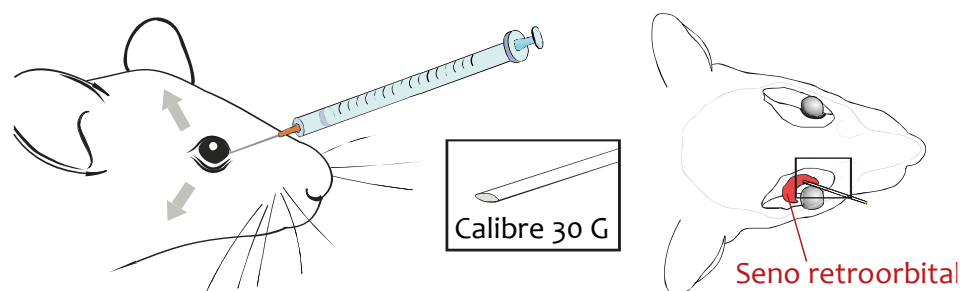
Para suprimir la expresión de PFKFB3 *in vivo*, se empleó una técnica que consiste en la administración intravenosa de virus adenoasociados (AAV) a través del seno retroorbital. Esta forma de administración nos exige seleccionar un serotipo vírico que pueda cruzar la barrera hematoencefálica. Por ello, se eligieron AAV con cápside pHp.eB, una modificación del serotipo AAV10, que ha demostrado presentar una transducción eficaz del sistema nervioso central mediante administración intravenosa (Chan *et al.*, 2017). En referencia a la especificidad, las secuencias insertadas se situaron bajo el control del promotor del gen de la GFAP, que es específica de los astrocitos. Se utilizó una versión corta de este promotor, denominada gfa-ABC1D, que con una reducción del 70 % de longitud frente al original, presenta esencialmente el mismo patrón de expresión y una actividad dos veces mayor (Lee *et al.*, 2008).

Para producir la recombinación, se añadió la secuencia codificante para la recombinasa CRE, concretamente una versión de eficiencia mejorada, iCRE (*improved* CRE). Para el diseño de esta estrategia con la excelente experiencia y colaboración del Profesor Gilles Bonvento (*École des Neurosciences*, París, Francia). Los adenovirus se adquirieron en la plataforma de reposición de vectores virales de la Universidad de Zúrich, Suiza.

6.1. Inyección retroorbital

Para la inyección a través del seno retroorbital, los ratones *Pfkfb3^{lox/lox}* de 3 y 10 meses de edad, se anestesiaron con sevoflurano (Sevorane, AbbVie) al 4 % para su inducción, seguido de 3-3,5 % para su mantenimiento, en un sistema de inhalación de aire suplementado con O₂ y NO₂ (0,4 y 0,8 litros/min, respectivamente) utilizando una columna de distribución de gas (Hersill H-3) y un vaporizador (InterMed Penlons Sigma Delta).

Se administró, en el seno retroorbital derecho, 1×10^{11} genomas virales en un volumen final de 50 μ l en PBS suplementado con 0,001 % de Pluronic® F-68 (Sigma Aldrich). Para la inyección, se aplicó una presión suave hacia abajo sobre la piel dorsal y ventral al ojo, para que sobresalga parcialmente de la cavidad, y se introdujo lentamente la aguja con el bisel hacia abajo, en el seno retroorbital del animal (Yardeni *et al.*, 2011) (**Esquema IV**). Se emplearon agujas de calibre 30 G y 8 mm de longitud. La duración total del procedimiento por ratón fue de menos de 10 minutos, incluyendo la anestesia y la recuperación.



Esquema IV. Inyección venosa de AAV en el seno retroorbital derecho. Para la inoculación del virus, se aplicó una pequeña presión para que el ojo sobresalga, y se introdujo la aguja con el bisel hacia el animal.

7. Obtención de células astrocíticas y neuronales de ratón adulto

7.1. Disgregación de tejido cerebral adulto

Para el aislamiento de células de cerebro de los ratones adultos (> 4 meses), se procesó el tejido mediante una disgregación enzimática y mecánica manual basada en el cultivo anteriormente comentado, ajustando los volúmenes (**Esquema V-A**).

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical e inmediatamente se realizó la decapitación. Se extrajo el cerebro y se diseccionó, descartando cerebelo y bulbos olfatorios. Se eliminó el exceso de sangre y las meninges mediante un lavado con D-PBS y arrastrando el tejido sobre papel absorbente. Una vez limpio, se fragmentó con un bisturí y se añadieron 2 ml por hemisferio de una solución de tripsinización, que consistió en EBSS suplementado con BSA 0,3 % (p/v), ADNasa tipo I a 20 µg/ml y tripsina 0,025 % (p/v). Esta solución se incubó 5 minutos a 37 °C en un baño termostatzado. Se disgregó mecánicamente mediante pipeteo con una pipeta serológica de 5 ml. Seguidamente, se devolvió al baño durante 10 minutos. La digestión enzimática se detuvo añadiendo un 10 % de suero fetal. Posteriormente, se centrifugó el pellet a 700 g a 4 °C durante 5 minutos.

El pellet tisular se resuspendió en una solución de disgregación, de EBSS suplementado con BSA 0,4 % (p/v) y ADNasa tipo I a 12 µg/ml para su disgregación mecánica, mediante pipeteo con una pipeta Pasteur siliconada y flameada. Se realizaron entre 5-10 pasos por la pipeta, dependiendo de la cantidad de tejido, con un volumen de 4 ml por hemisferio. El sobrenadante se pasó a través de un filtro de 70 µm y se recolectó en un tubo limpio. Se repitió el proceso para incrementar el rendimiento. El filtrado se centrifugó 3 minutos a 700 g y resuspendió en 1 ml de una solución comercial para eliminar glóbulos rojos (ref. 130-094-183; Miltenyi). Se incubó 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, se añadieron 10 ml de D-PBS y se centrifugó durante

10 minutos a 400 g. El pellet se resuspendió en D-PBS para proceder con el aislamiento por métodos inmunomagnéticos.



Esquema V. Disgregación de tejido cerebral adulto y aislamiento mediante marcaje inmunomagnético. Tras la disección, disgregación del cerebro adulto, y la eliminación de eritrocitos (A), se procedió con el aislamiento celular mediante tecnología MACS® (B).

7.2. Aislamiento y separación celular mediante métodos inmunomagnéticos

Tras conseguir una suspensión homogénea de células neurales individualizadas de cerebro adulto, se llevó a cabo la separación de las distintas poblaciones celulares mediante la Tecnología MACS® (*Magnetic Activated Cell Sorting*) (**Esquema V-B**). Para el aislamiento de astrocitos, se utilizó el Kit MicroBead Anti-ACSA-2 de ratón (#130-097-678; Miltenyi), y para el de las neuronas el Kit de Aislamiento de Neuronas de ratón (#130-098-752; Miltenyi) (Vicente-Gutierrez et al. 2019; Morant-Ferrando et al. 2023). La Tecnología MACS® está basada en el reconocimiento antigénico mediante anticuerpos específicos asociados a partículas magnéticas de tamaño nanométrico, para su posterior aislamiento en columnas, mediante un gradiente magnético intenso, consiguiendo un aislamiento celular con poca alteración celular. La purificación de astrocitos se basa en una separación positiva, es decir, la fracción unida a las perlas magnéticas es la astrocítica. Los anticuerpos asociados a estas partículas reconocen antígenos de superficie específicos de este tipo celular, concretamente ACSA-2 (del inglés, *Astrocyte Cell Surface Antigen-2*), expresado específicamente en astrocitos.

En cambio, el enriquecimiento de células neuronales se basa en una separación negativa, ya que los anticuerpos empleados son específicos del resto de poblaciones celulares presentes en el tejido cerebral, como ACSA-2 para astrocitos, el antígeno O4 para oligodendrocitos y el

CD11b para la microglía; así, las neuronas se eluyen por discriminación.

A continuación, se detalla el proceso realizado en el laboratorio, adaptado del protocolo específico de célula indicado por la casa comercial. En primer lugar, se centrifugaron las células procedentes de la disgregación cerebral [ver **apartado 7.1**] a 400 g 5 min, y se resuspendieron en 250 µl de D-PBS por hemisferio.

Marcaje inmunomagnético

Para el enriquecimiento en neuronas se añadieron, por hemisferio, 40 µl de los anticuerpos no-neuronales (*Non-Neuronal Cells Biotin-Antibody*) y se incubó 5 minutos a 4 °C. Se lavó con 1 ml de D-PBS y se añadieron 40 µl de las perlas magnéticas conjugadas con biotina (*α-Biotin MicroBeads*) y se incubó 10 minutos a 4 °C. Se ajustó hasta 1 ml de D-PBS.

Para el aislamiento de astrocitos se añadieron, por hemisferio, 30 µl del reactivo bloqueante (*FCR Blocking Reagent*) y se incubó 10 minutos a 4 °C. Se añadieron 30 µl de α-ACSA-2 y se incubó 15 minutos a 4 °C. Se lavó con 1 ml de D-PBS, se centrifugó 10 minutos a 400 g y se resuspendió en 1 ml de D-PBS.

Separación magnética

Se colocaron las columnas en el soporte magnético sobre tubos colectores y se hidrataron con 3 ml de D-PBS. Se añadió la correspondiente suspensión celular anterior y se lavó la columna 3 veces con 3 ml de D-PBS. La parte eluida se corresponde con las neuronas o con la fracción ACSA-2 negativa, según corresponda. Se retiró la columna del soporte y se colocó sobre un tubo colector nuevo, se añadieron 5 ml de D-PBS y se presionó con una jeringa (incluida). La fracción se corresponde con las células no-neuronales o con los astrocitos ACSA positivos.

8. Preparación, extracción y normalización de muestras

8.1. Extracción y cuantificación de proteínas

Extracción de proteínas

Para la obtención de extractos proteicos totales procedentes de cultivo se lavaron las células con PBS frío y se añadió el tampón RIPA suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa s [ver **apartado 3**]. Se mantuvieron en hielo 5 minutos, y se recogieron con ayuda de un raspador. Después, se sometieron a una sonicación suave a una frecuencia de 50-60 Hz

durante 10 minutos y se centrifugaron a 13000 *g* 20 minutos. Se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80 °C.

Para la normalización por mg de proteína de los diferentes experimentos, las células se lisaron con NaOH 0,1 M. Se añadieron ~25 µl/cm² de esta solución y dejó un mínimo de 30 minutos a 37 °C antes de realizar la cuantificación de proteínas por el método de BCA [ver **apartado 8.1**].

Para el tejido cerebral se empleó Tampón de Lisis, igualmente suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa correspondientes, y se mantuvo 30 minutos en hielo. Se realizó una sonicación al 10 % de intensidad. Tras una centrifugación de 16000 *g* durante 20 minutos, se congeló el sobrenadante a -80 °C, hasta su uso.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la concentración proteica de las muestras se realizó mediante el ensayo de ácido bicinonónico (BCA; Pierce™, ThermoScientific). Se trata de un método colorimétrico basado en la reducción del Cu⁺² a Cu⁺¹ en presencia de proteínas y medio alcalino (reacción de Biuret). La cantidad de Cu⁺¹ es proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución, reaccionando con el BCA y generándose un complejo que absorbe a una longitud de onda de 562 nm. La absorbancia se midió espectrofotométricamente en un Multiskan Ascent (Thermo Electron Corp Basingstoke). Las concentraciones se calcularon a partir de una curva patrón presente en la misma placa que las muestras, realizada con distintas concentraciones de BSA. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada una de las muestras, añadiendo 200-240 µl de la mezcla de BCA y 1-2 µl de la muestra por cada pocillo de una placa de 96.

8.2. Extracción y solubilización de mitocondrias

Con objeto de estudiar la población mitocondrial de los astrocitos y la organización de la CTE, fue necesaria la purificación de estos orgánulos. Se siguió un protocolo basado en centrifugaciones diferenciales y el posterior tratamiento con un detergente suave, la digitonina, para mantener la organización de los supercomplejos (Acín-Pérez *et al.*, 2008). La composición de los tampones empleados se describió en el **apartado 3**.

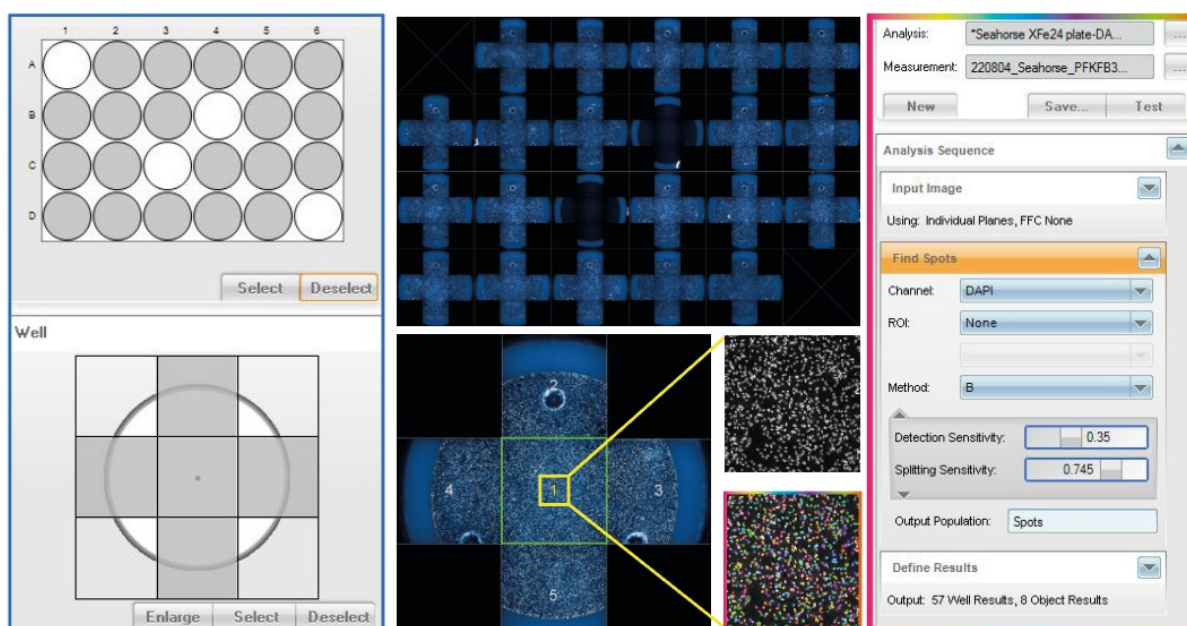
El pellet seco de astrocitos se homogenizó en 0,5-1 ml de Tampón A con un homogenizador eléctrico al que se le acopla un Potter-Elvehjem de vidrio-teflón. La muestra se colocó en el tubo de vidrio y, con la varilla asegurada sobre el homogenizador, se realizaron 10 pases. Una vez homogenizado, se añadió el mismo volumen de Tampón B y la muestra se centrifugó a

1000 g durante 5 minutos a 4 °C para eliminar núcleos y células no lisadas. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 12000 g 2 minutos a 4 °C, obteniéndose un pellet con la fracción mitocondrial. Este paso se repitió una vez más sobre las células no lisadas para incrementar el rendimiento. Las fracciones mitocondriales se lavaron con Tampón C y se centrifugaron de nuevo a 12000 g 2 min. Finalmente, se resuspendieron en Tampón D suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa.

Una vez obtenidas las mitocondrias se solubilizaron con digitonina (4 µg/µg de proteína). Tras una incubación de 5 minutos en hielo, se centrifugaron a 13000 g durante 30 minutos a 4 °C, y las mitocondrias solubilizadas en el sobrenadante se pasaron a un tubo limpio.

8.3. Cuantificación de núcleos con tinción DAPI

Para los experimentos realizados con la tecnología *Seahorse*, los resultados se normalizaron en función del número de núcleos (**Esquema VI**).



Esquema VI. Cuantificación de núcleos usando la tinción DAPI mediante análisis de imagen con Operetta CLS y software Harmony. Tras seleccionar los pocillos de interés y el área dentro de éstos, se utiliza la función de “Find spots” para la detección individual de los núcleos, según unos parámetros determinados.

Para ello, tras el experimento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % en metanol durante 30 minutos a RT, o bien O.N a 4 °C y, tras un lavado con PBS, se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; ref. D95429, Sigma) 0,1 µg/ml (p/v) en PBS durante 10 minutos. Se realizaron dos lavados con PBS y la placa se analizó en el microscopio *High Content Screening Operetta CLS* (Perkin Elmer). Para ello, se utilizó el software *Harmony*, con una

función de detección de puntos (*Find spots*), que identifica cada núcleo por separado. Se empleó el método B de cuantificación, con una sensibilidad de detección de 0,35 y una sensibilidad de división de 0,745 (**Esquema VI**).

9. Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas

9.1. Electroforesis desnaturalizante

Con objeto de analizar la abundancia de las proteínas de interés, éstas se sometieron a una electroforesis desnaturalizante, en presencia de SDS. La matriz consistió en geles de poliacrilamida (solución de acrilamida/bis-acrilamida 29:1; BioRad Laboratories) de 1,5 mm. Estos geles se constituyeron por un gel concentrador o *running* y uno separador o *stacking*. El primero, en la parte inferior, se preparó con distintos porcentajes de acrilamida según el peso molecular de las proteínas de interés, además de Tris-HCl 380 mM pH 8,8, SDS 0,1 %, PSA 0,1 % y N, N, N, N'-tetrametilendiamina (TEMED) 0,08 %. El segundo, se compuso de poliacrilamida al 10 % el stock (v/v), Tris-HCl 190 mM pH 6,8, SDS 0,1 % (p/v), persulfato amónico 0,1 % (p/v) y TEMED 0,1 % (v/v).

Para el seguimiento de los pesos moleculares, se utilizaron los marcadores comerciales *PageRuler™* y *PageRuler™ Plus* (Thermo Scientific™) para un rango de 10-180 y 10-250 kDa, respectivamente.

La muestra proteica (20-50 µg) se resuspendió en tampón de carga, y se hirvió 5 minutos a 100 °C. Posteriormente, las muestras se cargaron en el gel y se separaron utilizando un sistema de electroforesis vertical (MiniProtean®, BioRad Laboratories) y tampón de electroforesis Tris-glicina a 80 voltios durante 15-20 minutos, hasta la entrada de las proteínas en el gel separador, y posteriormente a 120 voltios constantes entre 60-120 minutos; dependiendo de la necesidad de separación de las proteínas de interés.

9.2. Electroforesis en condiciones nativas

Las muestras de mitocondria solubilizada (10-20 µg) se resuspendieron en tampón de carga para proporcionar densidad, color y carga negativa a la muestra. Posteriormente, se cargaron en geles nativos comerciales con un gradiente del porcentaje de acrilamida 3-12 % (NativePAGE™ 3 a 12 %, Bis-Tris, 1,0 mm; Life Technologies). La electroforesis se realizó a 40 V O.N, hasta que el frente marcado con el Serva-Blue comenzó a salir de la matriz; se empleó la

Solución de Cátodo para el interior de la cámara que forman los dos geles, y la Solución de Ánodo para el exterior.

9.3. Transferencia tipo Western blot e inmunodetección de proteínas

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se sometieron a electrotransferencia a membranas de 0,2 μm de nitrocelulosa (Hybond®, Amersham Biosciences) o de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (para las proteínas de la CTE). Las membranas de PVDF se activaron durante 10-15 minutos en metanol.

Se utilizó el sistema húmedo *Mini-Transblot* (Bio-Rad) en el seno de un Tampón de Transferencia. Para condiciones desnaturalizantes se sometió a un amperaje constante de 360 mA 180 minutos, en tampón Tris-glicina-metanol. Mientras que, para condiciones nativas, la electro-transferencia se realizó a 60 V constantes durante 90 minutos, y como tampón de transferencia se empleó Tampón de Bicarbonato.

Para evitar la formación de las uniones inespecíficas, las membranas se bloquearon durante 1 hora con leche desgrasada (Sveltesse, Nestle) al 5 % (p/v) en TTBS a RT. A continuación, se incubaron a 4 °C O.N en una solución de BSA al 2 % (p/v) en TTBS que contenía el anticuerpo primario correspondiente. Todos los anticuerpos están recogidos en la **Tabla I**.

Anticuerpo	Dilución	Ref.	Casa comercial
Actin	1/1000	A5441	Sigma
LC3	1/1000	NB100-2020	Novusbio
NBR1	1/1000	NBP1-71703	Novusbio
NDUFA9	1/1000	ab14713	Abcam
PFKFB1-4	1/500	sc-10096	SCBT
PFKFB2	1/500	ab234865	Abcam
PFKFB3	1/1000	ab181861	Abcam
P62	1/1000	P0067	Sigma
UQCRII	1/1000	ab14745	Abcam
conejo-HRP	1/20000	sc-2030	SCBT
OVEJA-HRP	1/20000	sc-2701	SCBT
ratón-HRP	1/30000	1858413	Pierce

Tabla I. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la inmunodetección de proteínas por transferencia Western. Listado de anticuerpos primarios (en azul) y secundarios (en naranja), incluyendo la dilución empleada y la casa comercial con su referencia.

Al siguiente día, las membranas se lavaron 3 veces con TTBS durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente una hora a RT, en leche al 2 % en TTBS. Todos los anticuerpos estaban conjugados con la proteína peroxidasa de rábano (HRP) que, en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otras moléculas específicas, generará una señal quimioluminiscente. Posteriormente, se realizaron otros 4 lavados con TTBS, el último con ese mismo tampón, pero carente de Tween, ya que puede interferir con algunos reactivos utilizados para el revelado. Por último, se incubaron las membranas, según la proteína a detectar, con los reactivos de quimioluminiscencia *SuperSignal™ West Femto* (Thermo Scientific™) o *WesternBright ECL HRP* (Advansta), siguiendo los tiempos e instrucciones de los fabricantes. La señal quimioluminiscente se recogió en un transiluminador *Fusion FX Vilber*.

9.4. Análisis y cuantificación de imágenes

Se realizaron mínimo 3 réplicas biológicamente independientes de cada experimento para realizar estadística. Las abundancias relativas de proteínas de las transferencias tipo *Western* se midieron por densitometría de las bandas, en la fase lineal de la exposición sin alcanzar la saturación, utilizando el software libre *FIJI (ImageJ 1.48u4)*.

Se analizó la intensidad relativa de las bandas eligiendo un área rectangular que englobara todas aquellas bandas que se quiere comparar o, alternativamente, examinando cada banda por separado utilizando un cuadrante de tamaño constante. Los valores obtenidos para cada banda se normalizaron con respecto al valor de la banda obtenida de su control de carga, que fue la actina. Los resultados se expresaron en número de veces respecto a la condición control de cada experimento, al que se le dio el valor de 1.

En particular, para el análisis de los supercomplejos mitocondriales, no es necesaria esta normalización con respecto al control de carga, puesto que las bandas que se analizan están en la misma membrana y lo que se interpreta es la ratio entre el complejo libre y los supercomplejos.

10. Determinación de flujos metabólicos con radioisótopos

Para la determinación de diferentes flujos metabólicos se emplearon algunos sustratos marcados con ^{14}C y 3H . La base de estos experimentos es la producción de $^{14}CO_2$ o 3H_2O a partir de esos sustratos en el transcurso de rutas metabólicas específicas en un tiempo de incubación

determinada. El sustrato radiactivo (definido como “caliente” o “marcado”) se añade en concentraciones despreciables en comparación con un sustrato no radiactivo (denominado “frío”). Las unidades de radiactividad empleada en cada experimento se muestran en micro curios (μCi), ya que es la más usada en el campo. Todos los sustratos radiactivos se adquirieron en Perkin Elmer, y se emplearon en las instalaciones de seguridad adecuadas disponibles en el centro de investigación.

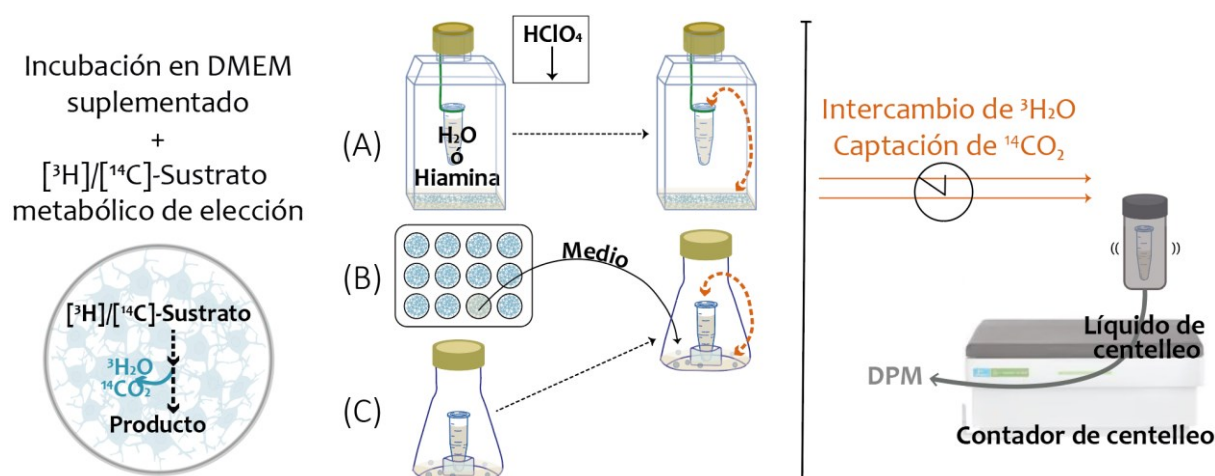
Determinación de flujos metabólicos en cultivo

Para ello, los astrocitos se sembraron en el fondo de frascos de cultivo de 25 cm^2 (ref. 353108, Fisher), cuyo área es de aproximadamente $8,8\text{ cm}^2$, o bien en placas de 12 pocillos. El día del experimento se incubaron con DMEM de experimentación con el sustrato adecuadamente marcado con el radioisótopo (**Esquema VII**), a $37\text{ }^\circ\text{C}$ con agitación suave.

Para la determinación del $^{14}\text{CO}_2$ (**Esquema VII-A**) se fijó un tubo de 1,5 ml mediante un alambre sujeto a la boca del frasco, con 1 ml de hidróxido de bencetonio (conocido también como hiamina, ref. 6003005, Perkin Elmer), una sal de amonio cuaternario que presenta gran avidéz por el CO_2 . Las reacciones se detuvieron añadiendo un 0,2 % de HClO_4 mediante una jeringuilla a través del tapón de goma que mantiene herméticamente cerrados los frascos. Se incubaron a $37\text{ }^\circ\text{C}$ con agitación suave durante 1 hora para permitir la captación de CO_2 por parte de la hiamina. Pasado este tiempo, se recolectaron los tubos de 1,5 ml para cada condición sobre 10 ml de líquido de centello en viales independientes. En una puesta a punto previa se determinó que la eficiencia de recuperación es del 70 % del total de CO_2 formado.

La determinación del $^3\text{H}_2\text{O}$ se realizó de manera análoga, pero sustituyendo la hiamina por agua destilada. En este caso se requiere un tiempo de recuperación mayor para que el agua del medio de incubación se equilibre con la del tubo. Para ello, los frascos se dejaron durante 72 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ con agitación suave, consiguiéndose así, una eficiencia de recuperación del 28 %. El experimento se realizó en placas de 12 pocillos (1 ml de medio/pocillo), trasvasando el medio de cultivo después de la adición del HClO_4 a un pequeño matraz especial, que presenta un pocillo central estanco donde se coloca el tubo con agua (**Esquema VII-B**).

Para la normalización se llevaron frascos/pocillo hermanos con células lisadas con NaOH 0,1 mM y se determinó la concentración de proteína.



Esquema VII. Determinación de flujos metabólicos mediante sustratos marcados radioisotópicamente. Se observan dos estrategias para la determinación de flujos metabólicos in vitro: (A) en frascos con un tubo de 1,5 ml de agua o hiamina para la captación del radioisótopo o (B), en placa donde se recolecta el medio de cada pocillo y se trasvase a unos matraces con un compartimento estanco. También se observa una adaptación del método para células procedentes de cerebro adulto (C).

Determinación de flujos metabólicos *ex vivo*

Para la determinación de los flujos metabólicos, particularmente el flujo glucolítico, en cortes sagitales del cerebro de ratón adulto, las secciones se incubaron 1 hora con DMEM de experimentación. Posteriormente, se pesó cada fracción de tejido en una balanza de precisión, secándola previamente sobre un papel de filtro. Se colocaron sobre los matraces y se añadió 1,5 ml del medio de incubación suplementado con el sustrato marcado y se incubó a 37 °C hasta parar la reacción con HClO_4 . Se normalizó por mg de tejido húmedo.

Determinación de la radiactividad

En todos los experimentos se llevaron en paralelo frascos sin células, cuyos valores de radiactividad se restaron a los de las muestras. Además, se tomó una alícuota del medio para calcular la radiactividad específica, esto es, la correlación entre la radiactividad y los moles de sustrato frío empleados. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo *Tri-Carb 4810 TR* (Perkin Elmer).

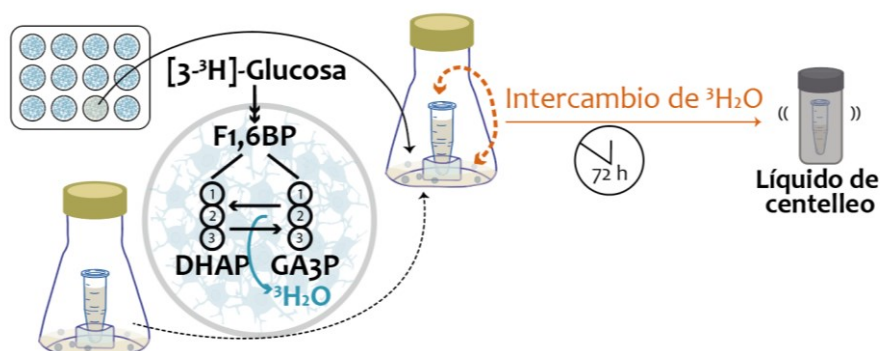
Para los cálculos se tuvo en cuenta la eficiencia de recuperación. Finalmente, los resultados se expresaron como nmol de sustrato por hora y por mg de proteína o de tejido.

11. Estudio del metabolismo de glucosa

11.1. Determinación de la glucólisis a partir de D-[3-³H]-glucosa

Siguiendo el método descrito en el **apartado 10 (Esquema VII-B)**, los astrocitos en cultivo se incubaron en placas de 12 pocillos durante 3 horas con DMEM de experimentación suplementado con 2 $\mu\text{Ci/ml}$ de D-[3-³H]-glucosa, la cual va a utilizarse, entre otras, en la ruta glucolítica, donde se generará de manera específica una molécula de ³H₂O (**Esquema VIII**). Esta liberación de ³H₂O se da al nivel de la reacción de isomerización entre la DHAP y el GA3P.

Por otro lado, como se describió en el **apartado 10 (Esquema VII-C)**, cortes procedentes de tejido cerebral adulto se incubaron en los matraces especiales anteriormente descritos con 1 ml de DMEM de experimentación suplementado con 2 $\mu\text{Ci/ml}$ de D-[3-³H]-glucosa durante 3 horas.

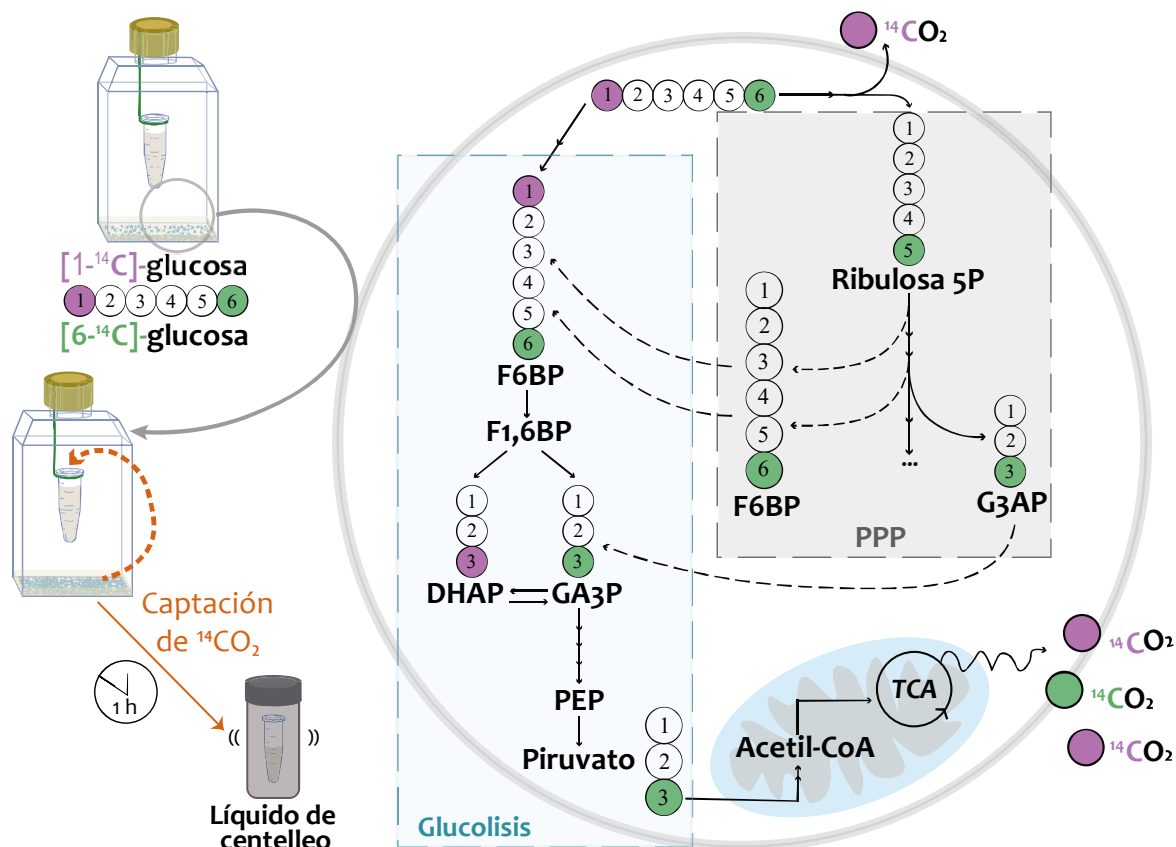


Esquema VIII. Determinación del flujo glucolítico a partir de D-[3-³H]-glucosa. La [3-³H]-glucosa que entra en la ruta glucolítica va a producir ³H₂O a nivel de la reacción de la isomerización entre DHAP y GA3P.

11.2. Determinación de la PPP a partir de D-[1-¹⁴C]-glucosa y D-[6-¹⁴C]-glucosa

Para determinar el flujo neto de la vía de las PPP, se realizan dos experimentos en paralelo: uno con D-[1-¹⁴C]-glucosa y otro con D-[6-¹⁴C]-glucosa. Siguiendo el método descrito en el **apartado 10 (Esquema VII-A)**, los astrocitos se incubaron en DMEM de experimentación suplementado con 0,3 $\mu\text{Ci/ml}$ de ambas glucosas por separado durante 90 minutos (**Esquema IX**). El ¹⁴CO₂ originado a partir del metabolismo de la D-[1-¹⁴C]-glucosa proviene de la descarboxilación catalizada por la *6-fosfogluconato deshidrogenasa* (PGD) en la PPP, y de la descarboxilación del acetil-CoA en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA, del inglés *TriCarboxylic Acid cycle*). A su vez, el ¹⁴CO₂ generado a partir del metabolismo de la D-[6-¹⁴C]-glucosa proviene exclusivamente de la actividad del TCA. El flujo neto de la PPP se obtuvo mediante el

cálculo de la diferencia entre la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de la glucosa marcada en el carbono 1 y la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de la glucosa marcada en carbono 6.



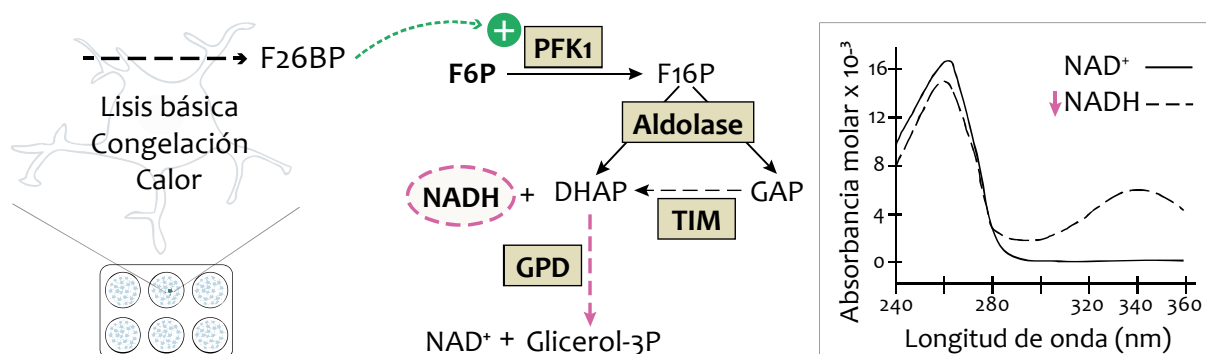
Esquema IX. Determinación del flujo de PPP a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ -glucosa y $[6-^{14}\text{C}]$ -glucosa. La $[1-^{14}\text{C}]$ -glucosa y la $[6-^{14}\text{C}]$ -glucosa se incubaron por separado. El $^{14}\text{CO}_2$ originado a partir del metabolismo de la primera proviene de la descarboxilación tanto en la PPP como en el TCA, mientras que el generado a partir de la segunda, solamente de la actividad del TCA. El flujo neto de la PPP se obtiene restando la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ -glucosa menos la producida a partir de $[6-^{14}\text{C}]$ -glucosa.

11.3. Determinación de los niveles de F26BP

El protocolo utilizado consiste en una medida indirecta de la modulación alostérica positiva de la F26BP sobre la enzima PFK1, acoplada a una serie de reacciones (**Esquema X**). Las muestras se midieron en un espectrofotómetro a 340 nm a diferentes tiempos para evaluar la caída de absorbancia como consecuencia del consumo de NADH por dichas reacciones acopladas.

Para extraer la F26BP intracelular, en primer lugar, se lavaron las células dos veces con PBS, se tripsinizaron y se pipetearon en un tubo de 1,5 ml previamente pesado. Se centrifugaron para obtener un pellet seco y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido. Tras pesar los tubos con las células, se añadió NaOH 0,1 M en proporción 1/5 (p/v). Las muestras se agitaron y calentaron a 80 °C durante 5 minutos. Tras enfriarlas en hielo, se centrifugaron a 20000 g 20 minutos a 4 °C y el sobrenadante se congeló a -80 °C hasta la determinación.

Para el proceso de determinación de la F26BP, se preparó una mezcla de reacción 2X a base de Tris-HCl 0,1 M pH 8, MgCl₂ 5 mM, F6P 0,1 M y NADH·2Na⁺ (ref. N8129-1G, Sigma) 0,25 mg/ml. Inmediatamente antes del pipetear la mezcla, se adicionó 1 μl/ml de aldolasa (ref. 102644, Boehringer), 1 μl/ml de TIM-Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (ref. G-1881, Sigma) y 10 mU/ml de PFK1, pirofosfato-dependiente (casera).



Esquema X. Determinación de los niveles de F_{2,6}BP por reacciones acopladas y medida de absorbancia del NADH. La F_{2,6}BP se mide de forma indirecta, a través de su efecto alostérico positivo sobre la PFK1, acoplado a otras reacciones que van a consumir NADH. La cantidad de F_{2,6}BP es proporcional a la bajada de absorbancia del NADH, medida a 340 nM.

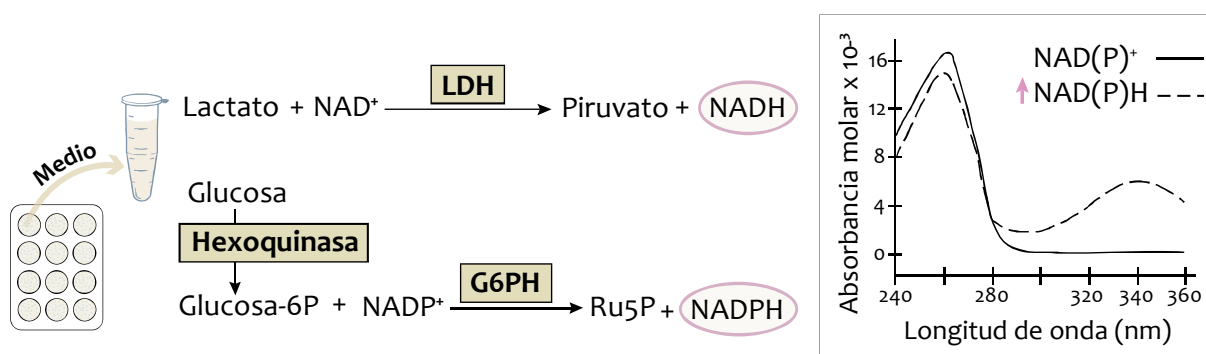
En una placa de 96 pocillos transparente se pipetearon, por cada pocillo, 10 μl de muestra, 125 μl de agua y 150 μl de la mezcla de reacción 2X, incluyendo pocillos sin muestra (con 10 μl de NaOH 0,1 M). La placa se incubó 10 minutos a 30 °C. Mientras, a un pequeño volumen de la mezcla de reacción sin enzimas se añadió pirofosfato 3 mg/ml. Transcurrida la incubación se añadieron 15 μl de esta mezcla a cada pocillo para disparar la reacción. La placa se introdujo para su análisis en un espectrofotómetro *Varioskan Flash* (Thermo Scientific), y se monitorizó la absorbancia a 340 nm cada 2 minutos durante 30 minutos. Se calcularon las pendientes y se normalizaron según el número de veces con respecto a la condición control, a la que se asignó el valor de referencia 1.

11.4. Medida de glucosa y lactato extracelulares

Las concentraciones de glucosa y lactato se midieron espectrofotométricamente a partir del medio de cultivo, mediante el incremento de absorbancia a 340 nm por la aparición de NADPH y NADH, respectivamente, en un *Varioskan Flash* (Thermo Scientific). La lectura de la absorbancia se realizó *a tiempo final*, por lo que los tiempos de incubación son suficientes para que toda la glucosa/lactato se agoten durante la reacción. Para obtener la muestra, se recogió directamente el medio y se congeló a -20 °C hasta el día de la determinación.

Para la determinación de glucosa, se preparó una mezcla de reacción 2X con tampón Tris-HCl 0,1 M y $MgCl_2$ 10 mM pH 8, suplementado con ATP (ref. A3377, Sigma) 1 mg/ml, $NADP^+$ (ref. N0505, Sigma) 1 mg/ml y las enzimas G6PDH (1 U/ml)-hexoquinasa (2 U/ml) (Herrero-Mendez *et al.*, 2009). En una placa transparente de 96 pocillos se añadió, por pocillo, 5 μ l de medio, 145 μ l de agua destilada y 150 μ l de la mezcla de reacción 2X. Se incluyeron pocillos sin medio (150 μ l de agua). Se incubó durante 10 minutos a RT y se determinó la absorbancia a 340 nm (**Esquema XI**).

Para la determinación de lactato, se preparó una mezcla de reacción 2X con tampón 0,25 M de glicina, 0,5 M de hidracina y 1 mM de EDTA a pH 9,5, suplementado con 1 mM NAD^+ (ref. N6522, Sigma) y 22,5 U/ml de la enzima lactato deshidrogenasa. En la misma placa de 96 pocillos se añadió, por pocillo, entre 5-30 μ l de medio, según el tiempo de incubación para permitir la detección del NADH, 120-145 μ l de agua destilada y 150 μ l de la mezcla de reacción 2X. Se incluyeron pocillos con medio no incubado con células, utilizados como blancos. Se incubó la placa durante 60-120 minutos a 37 °C y se determinó la absorbancia a 340 nm.



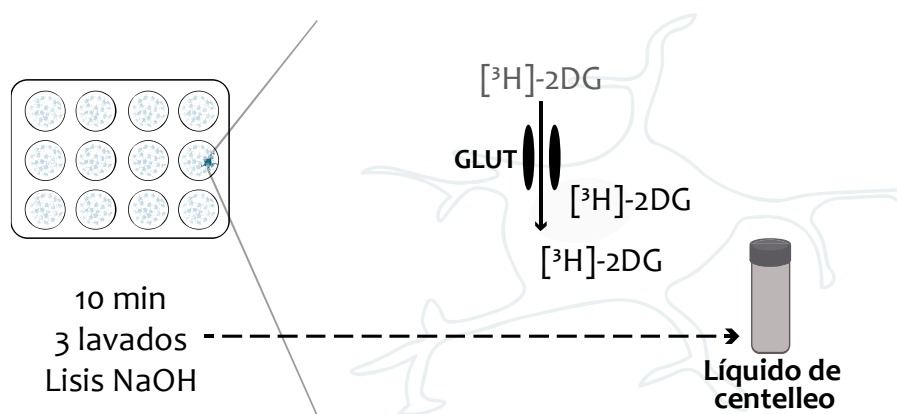
Esquema XI. Medida de glucosa y lactato extracelulares. Para la determinación de glucosa y lactato del medio extracelular, se midió la producción de NADH y NADPH a partir de unas reacciones acopladas cuyo sustrato era el lactato y la glucosa, respectivamente.

Una vez sustraídas las absorbancias de los blancos, las concentraciones de glucosa/lactato se calcularon siguiendo la *Ley de Lambert-Beer*, que indica que la absorbancia es proporcional a la concentración por la longitud de paso de luz (1 cm) y por el coeficiente de extinción molar, siendo este último para el NADH y el NADPH de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Para obtener el valor final de concentración se multiplicaron por los factores de dilución y se normalizó por los mg de proteína [ver apartado 8.1].

11.5. Determinación de la captación de deoxi-D-glucosa, 2-[1,2- ^3H (N)]

Como aproximación para determinar la captación de glucosa se utilizó 2-DG, un análogo de

ésta que entra por los mismos transportadores, pero una vez dentro, no se puede metabolizar. Incubando con este compuesto durante tiempos cortos, se pudo inferir la captación de glucosa. Para ello, se incubaron las células en DMEM de experimentación suplementado con 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de deoxi-D-glucose,2-[1,2- $^3\text{H}(\text{N})$] (^3H]-2DG) durante 20 minutos (**Esquema XII**). Transcurrido el tiempo, los pocillos se lavaron rápidamente con PBS tres veces y las células se lisaron con NaOH 0,1 M. Como blancos se emplearon controles celulares a los que se les añadió el medio radiactivo durante 1 segundo e inmediatamente se lavaron tres veces para valorar la cantidad de radiactividad que se quedaba adherida. El lisado se pasó a un tubo con 10 ml de líquido de centelleo y se midió la radiactividad del ^3H en un contador de centelleo *Tri-Carb 4810 TR* (Perkin Elmer).



Esquema XII. Determinación radioisotópica de la captación de ^3H]-2DG. Las células se incubaron con ^3H]-2DG durante 10 minutos, se lavaron y lisaron para valorar la cantidad de radiactividad captada.

11.6. Determinación de los niveles de glucógeno

A la hora de determinar los niveles de glucógeno intracelular se empleó un protocolo que consistió en escindir esta molécula en monómeros de glucosa y, posteriormente, medir esta glucosa por el método anteriormente comentado [ver **apartado 11.4**]. Para ello, tras la lisis y desproteinización de las células, se realizó una incubación con la enzima α -amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*, capaz de hidrolizar los enlaces glucosídicos α -D-(1-4) y α -D-(1-6).

Determinación del glucógeno intracelular de cultivo de astrocitos

En primer lugar, se lavaron dos veces las células con PBS y se lisaron con 40 μl de NaOH 0,1 M por cm^2 , con ayuda de un raspador, y se pasaron a un tubo de 2 ml. La muestra se calentó a 80 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, se enfrió en hielo y se le añadió 1 ml de etanol puro frío. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 g 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se añadió, tras dejar secar completamente el pellet, 500 μl de acetato sódico 50 mM pH 4,8. Se mezcló

fuertemente y cada muestra se incubó con 1 U de α -amiloglucosidasa, 1 hora a 37 °C.

Paralelamente, se preparó la mezcla de reacción 2X descrita para la medición de la glucosa, pero sin incluir las enzimas. Una vez finalizada la incubación, la muestra se mezcló 1:1 con la mezcla, y se midió la absorbancia inicial en el espectrofotómetro *Uvikon XL (70/99-90283 SECOMAN)*. Se añadieron, a cada cubeta, las enzimas G6PDH-hexoquinasa y se incubó 10 minutos a RT. Se repitió la medida de absorbancia, en presencia de las enzimas, y a los valores resultantes se sustrajeron los obtenidos en la medida inicial. Este procedimiento difiere en este punto del comentado anteriormente debido a que las concentraciones de glucógeno obtenidas son bastante bajas. Por esta razón, se eliminó la variabilidad de absorbancia entre cubetas (o pocillos) para evitar introducir errores importantes. El tratamiento posterior de los datos es análogo al anterior [ver **apartado 11.4**].

Determinación del glucógeno del tejido cerebral

Para la determinación del glucógeno procedente de tejido cerebral, se requiere un mayor procesado previo de la muestra. En primer lugar, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y seguidamente se extrajo el cerebro. Con un bisturí se realizó un corte por la línea media y el tejido destinado para la determinación de glucógeno se colocó sobre un cuadrado de papel de aluminio, se empaquetó y aplastó suavemente para asegurar la rápida y homogénea congelación. Acto seguido e inmediatamente se sumergió en nitrógeno líquido.

El tejido se pulverizó con ayuda de un mortero de cerámica, previamente enfriado con nitrógeno líquido, y se pasó a un tubo de 2 ml previamente pesado. El peso del tejido seco se determinó pesando de nuevo el tubo con la muestra y posteriormente, se resuspendió en HClO₄ al 4 % (p/v) en proporción 1:5, y se dejó incubando a 4 °C durante 16 horas para permitir la extracción del glucógeno. Transcurrido este tiempo, se neutralizó con KOH 5 M, para neutralizar el pH a 7. Se centrifugó a 1500 g 15 minutos, y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio. Se comprobó si estaba bien neutralizado; en caso contrario, se ajustó el pH.

A partir de aquí, la mitad de la muestra se destinó a determinar la glucosa libre presente en el tejido, puesto que, a diferencia del cultivo, hay una gran cantidad de glucosa libre. Esta concentración de glucosa libre se sustrajo ya que no forma parte del glucógeno. De este modo, a la muestra se añadió acetato sódico 100 mM y se dividió en dos; a una mitad se le añadió 10 U de α -amiloglucosidasa y a la otra no. Finalmente, ambas se incubaron durante 2 horas a 37 °C con agitación.

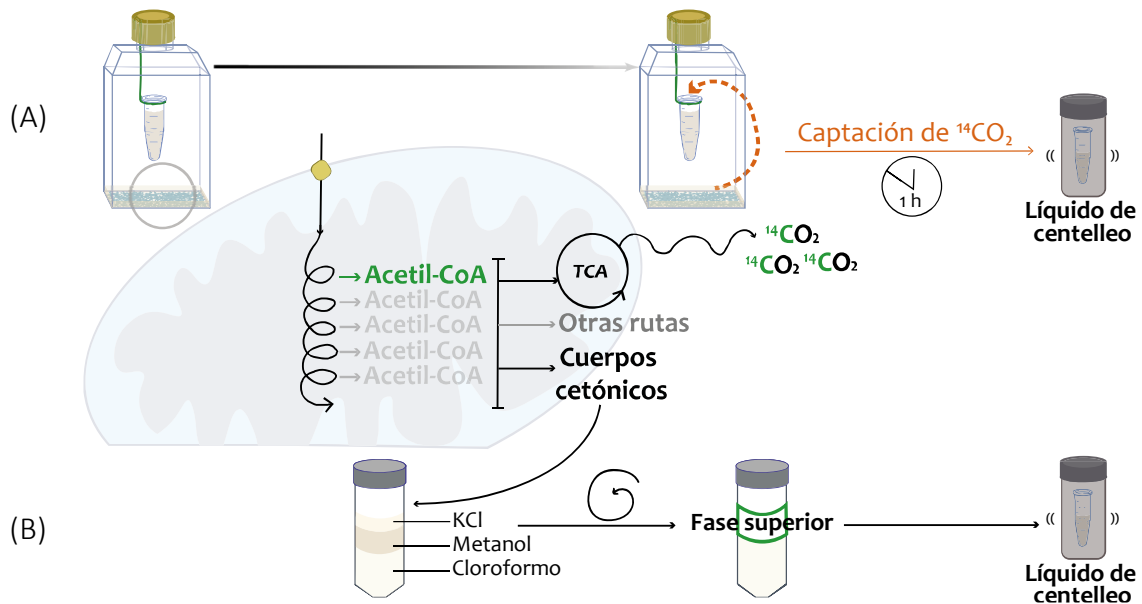
En este punto, el protocolo fue equivalente al comentado para los cultivos de astrocitos. No obstante, para la determinación de la concentración total del glucógeno se empleó la siguiente fórmula: la diferencia entre la concentración de glucosa total (muestras tratadas con α -amiloglucosidasa) y la de glucosa libre (muestras sin tratar).

12. Análisis del metabolismo de ácidos grasos

12.1. Determinación de la descarboxilación del [1-¹⁴C]-palmitato y formación de cuerpos cetónicos

Para analizar la metabolización de los ácidos grasos, se determinó la metabolización de [1-¹⁴C]-palmitato y, además, se utilizó el medio de este experimento para analizar la producción de cuerpos cetónicos marcados con ¹⁴C. En el primer ciclo de reacciones de la β -oxidación del [1-¹⁴C]-palmitato, se va a producir acetil-CoA marcado en su carbono 1. Este puede dirigirse hacia su descarboxilación en el TCA, produciendo CO₂ en la primera vuelta, o bien formar cuerpos cetónicos, los cuales pueden liberarse al exterior celular.

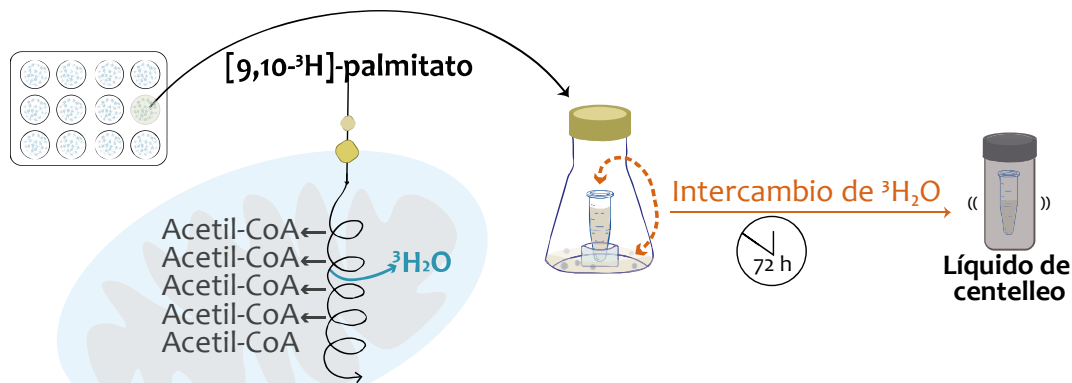
Siguiendo el protocolo descrito en el **apartado 10 (Esquema VII-A)**, los astrocitos se incubaron en DMEM de experimentación suplementado con 10 μ M de palmitato frío y 0,25 μ Ci/ml del [1-¹⁴C]-palmitato, durante 90 minutos (**Esquema XIII-A**). En este caso, se añadió también palmitato frío conjugado con BSA [ver **apartado 3**], a una concentración de 10 μ M, ya que no está presente en la composición del DMEM. Así se generó un gradiente necesario para promover su entrada dentro la célula. Además, esto nos permitió determinar, de una forma más precisa, la actividad específica de dicho sustrato. Los cuerpos cetónicos se extrajeron como producto no volátil y soluble en ácido (**Esquema XIII-B**). Así, tras parar la reacción con HClO₄, se recolectó 1 ml de medio y se pasó a un tubo deslipidado que contenía 8 volúmenes de cloroformo/metanol (2:1, v/v) y 2 volúmenes de KCl (0,1 M). Tras la agitación, se centrifugó 5 minutos a 3000 g y se tomaron 2 ml de la fase acuosa superior para pasarlos a un tubo nuevo con 4 volúmenes de la mezcla anterior, para obtener una muestra más pura. Se centrifugó de nuevo y se cogieron tres alícuotas de 1 ml de la fase acuosa que se trasvasaron a viales con líquido de centelleo para la determinación de la radiactividad.



Esquema XIII. Determinación de la descarboxilación del [1- ^{14}C]-palmitato y de la formación de cuerpos cetónicos. El [1- ^{14}C]-palmitato se va a convertir en acetil-CoA (el marcado con ^{14}C se muestra en verde) en la β -oxidación, que se descarboxilará en el TCA, produciendo $^{14}\text{CO}_2$ (A). Los cuerpos cetónicos neutralizados con KCl se separan de los componentes lipídicos mediante un protocolo de extracción con metanol-cloroformo, de forma que se mide la radiactividad de la fase acuosa (B).

12.2. Determinación de la β -oxidación a partir de [9,10- ^3H]-palmitato

Para determinar el flujo de la β -oxidación *per se*, sin tener en cuenta el TCA, se empleó palmitato marcado con tritio en los carbonos 9 y 10 (**Esquema XIV**). Mediante este método se va a producir $^3\text{H}_2\text{O}$ en las reacciones catalizadas por las acil-CoA deshidrogenasas (Kler, Sherratt y Turnbull, 1992; Sayre *et al.*, 2017).



Esquema XIV. Determinación de la β -oxidación a partir de [9,10- ^3H]-palmitato. Tras la entrada del palmitato en la mitocondria, entrará en la β -oxidación, produciendo $^3\text{H}_2\text{O}$ en las reacciones catalizadas por las acil-CoA deshidrogenasas.

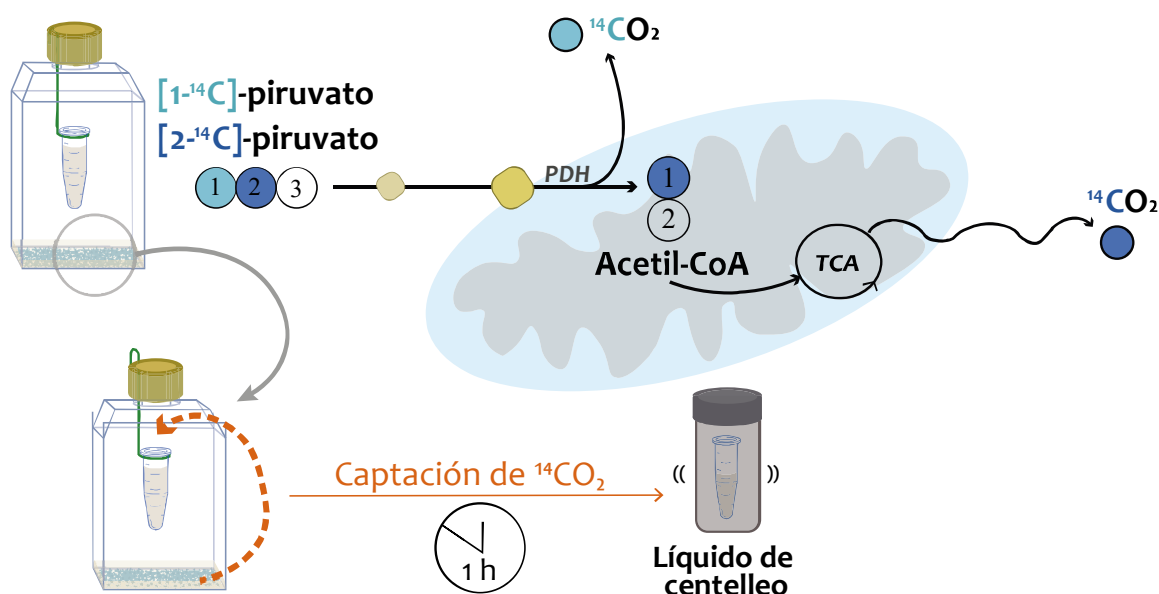
Según el protocolo descrito en el **apartado 10 (Esquema VII-A)**, los astrocitos se incubaron en DMEM de experimentación suplementado con palmitato frío 10 μM y [9,10- ^3H]-palmitato 1 $\mu\text{Ci/ml}$ durante 3 horas.

13. Análisis del metabolismo de piruvato

El piruvato es un compuesto esencial en el metabolismo celular. Se forma principalmente a través de la glucólisis, donde la glucosa se descompone en piruvato en el citoplasma. Además, ciertos aminoácidos, como la alanina y serina, pueden convertirse en piruvato. También se puede formar a partir del lactato, proceso que, en algunas células como las neuronas, es muy relevante metabólicamente. En referencia a su destino metabólico, en el caso de los astrocitos se sabe que el piruvato intracelular está destinado preferentemente a la formación de lactato, mediante la acción de la lactato deshidrogenasa (cita). Además, puede descarboxilarse oxidativamente mediante la piruvato deshidrogenasa (PDH) mitocondrial a acetil-CoA, o carboxilarse mediante la piruvato carboxilasa mitocondrial a oxalacetato. Además puede ser transaminado a alanina mediante la acción de la alanina aminotransferasa (Denker *et al.*, 2023). Su versatilidad metabólica lo convierte en un punto crucial en la producción de energía.

13.1. Determinación de la descarboxilación del [1-¹⁴C]-piruvato

Se evaluó el consumo de piruvato mediante la cuantificación de CO₂ originado en la reacción catalizada por la PDH en la matriz mitocondrial, a partir de [1-¹⁴C]-piruvato (**Esquema XV**). Esta determinación es posible puesto que el carbono 1 es el que se descarboxila específicamente en esta reacción, mientras que el 2 y el 3 formarán parte del acetil-CoA producido.



Esquema XV. Determinación de la producción de ¹⁴CO₂ a partir de [1-¹⁴C]-piruvato y [2-¹⁴C]-piruvato. Ambos piruvatos se incuban por separado. Tras entrar a la mitocondria, es convertido en acetil-CoA por la PDH, perdiéndose el carbono 1 marcado en forma de ¹⁴CO₂. Posteriormente, ese acetil-CoA se descarboxilará en el TCA, produciendo ¹⁴CO₂ del carbono 2 marcado.

Siguiendo el protocolo descrito en el **apartado 10 (Esquema VII-A)**, los astrocitos se incubaron en DMEM de experimentación con 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -piruvato durante 90 minutos.

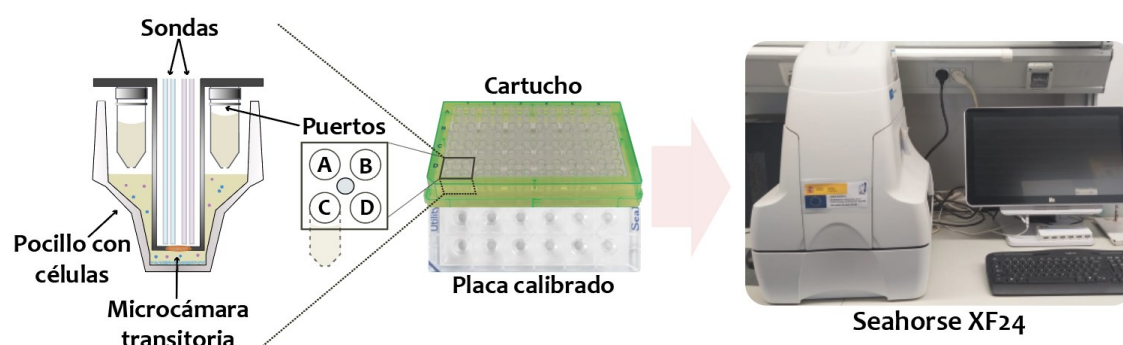
13.2. Determinación de la descarboxilación del $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -piruvato

Se analizó la entrada en el TCA del acetil-CoA procedente del piruvato, lugar donde producirá CO_2 ; al no estar marcado el carbono 1, se evita la señal procedente de la acción de la PDH (**Esquema XV**).

Siguiendo el protocolo descrito en el **apartado 10 (Esquema VII-A)**, los astrocitos se incubaron en DMEM de experimentación con 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -piruvato durante 90 minutos.

14. Determinación de la tasa de consumo de oxígeno

La determinación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR), como un indicador de la respiración mitocondrial, se realizó con el analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Agilent Technology) (**Esquema XVI**).

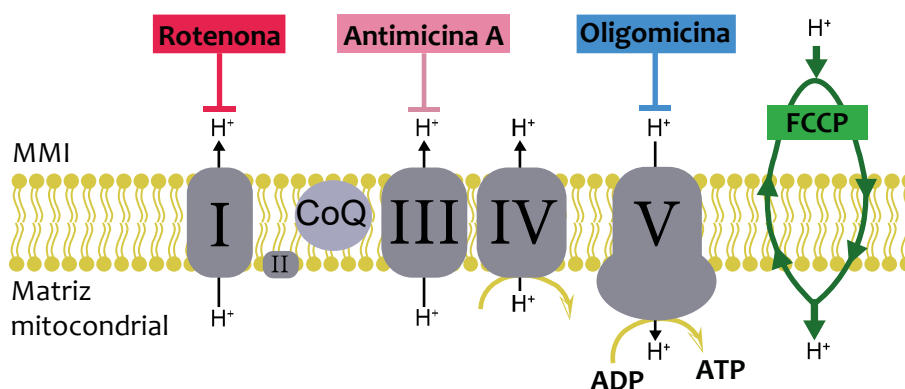


Esquema XVI. Analizador Seahorse XF24, con representación de los cartuchos. Se muestra la placa de calibrado bajo un cartucho real; los puertos del cartucho están representados a la izquierda sobre un pocillo con células. Las sondas descienden para mezclar el medio y medir el consumo de oxígeno y la tasa de acidificación, creando una microcámara transitoria entre estas y las células. A la derecha se puede observar el aparato Seahorse XF24.

Este instrumento es capaz de medir a tiempo real el consumo de oxígeno y la liberación de protones, mediante el uso de unas sondas incorporadas en unos cartuchos especiales. Además, estos cartuchos integran cuatro puertos de inyección, lo que permite la adición de diversos moduladores que afectan a la actividad de la CTE mitocondrial.

El proceso de análisis en el sistema implica ciclos de mezcla y medición; las sondas mezclan el medio para restaurar los niveles de oxígeno y protones y, después, forman una microcámara transitoria donde se realiza la medición a tiempo real. Siguiendo el protocolo estándar

conocido como *MitoStress*, se adicionó desde los distintos puertos una serie de compuestos (**Esquema XVII**). En primer lugar, tras una lectura de la OCR basal, se añadió oligomicina, la cual va a inhibir la ATP sintasa, bloqueando el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna (MMI). Posteriormente se agregó carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), un agente desacoplante que disipa el gradiente de protones; el flujo de electrones se desinhibe y el consumo de oxígeno por el complejo IV puede alcanzar valores máximos. Finalmente se adicionó rotenona y antimicina A, que inhiben la actividad de complejo I y III, respectivamente. La rotenona va a interrumpir la transferencia de electrones desde el NADH a la CTE, pero todavía se mantendría el flujo de electrones al complejo III. Con la antimicina A se bloquea el flujo desde el complejo I al IV, inhibiendo completamente la CTE. El OCR que permanece tras la adición de los inhibidores, se debe al consumo de oxígeno no mitocondrial.



Esquema XVII. Efecto de los diferentes inhibidores sobre la CTE mediante el protocolo de *MitoStress* con la tecnología Seahorse. Se añadieron en orden: oligomicina, inhibidor de la ATP sintasa; FCCP, agente desacoplante; rotenona y antimicina, inhibidores de los complejos I y III, respectivamente.

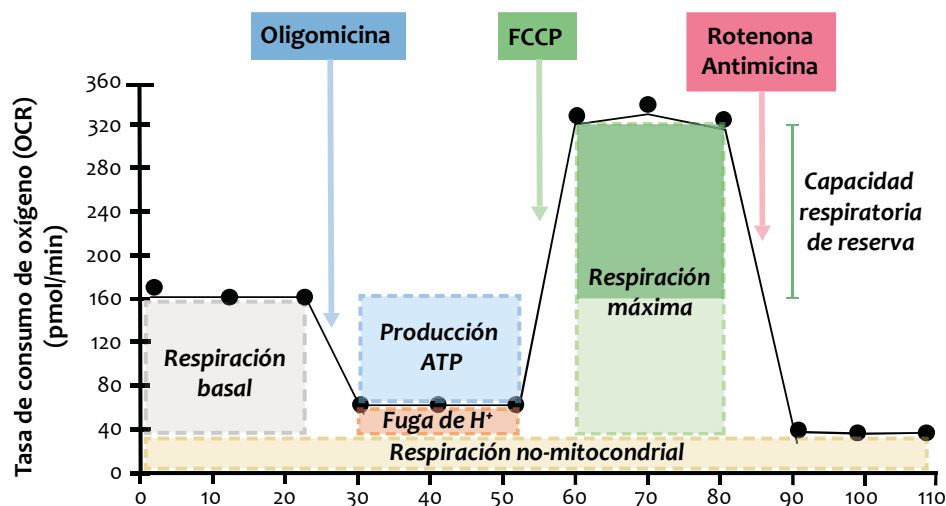
Tasa de consumo de oxígeno

En primer lugar, se sembraron 100000 células/cm² en placas estándar de Seahorse de 24 pocillos. La densidad se puso a punto para este tipo de placas, ya que se observó una menor adhesión de las células en comparación con otras placas empleadas. Se dejaron 2-4 pocillos sin células, que se usaron como blancos el día del experimento. Entre 12-20 horas antes del experimento se dejó hidratando el cartucho, añadiendo 500 µl de la Solución de Calibrado proporcionada por Agilent a cada pocillo de la placa. Se mantuvo a 37 °C en un incubador sin atmósfera de CO₂.

El día del experimento se cambió el DMEM de cultivo por DMEM de experimentación. Se realizó un lavado con el propio medio y se añadieron 500 µl por pocillo. A continuación, se

introdujo en el incubador sin atmósfera de CO₂ a 37 °C, durante 1 hora para equilibrar el bicarbonato presente en las células antes de comenzar. Paralelamente se prepararon los inhibidores; se diluyeron a 10X y se añadieron en los puertos correspondientes con el volumen adecuado para que al añadirse queden a 1X (en los puertos A, B, C y D se añadieron 56, 62, 69 y 77 µl, respectivamente). Posteriormente, el cartucho se colocó en el Seahorse y, tras un calibrado del equipo, se introdujo la placa con células.

El protocolo diseñado para llevar a cabo este experimento consistió en inyectar los compuestos descritos anteriormente de forma secuencial, mientras el equipo registra los datos de OCR y ECAR a tiempo real. En primer lugar, se tomaron tres medidas de OCR, que representan la respiración basal. A continuación, se inyectó la oligomicina (25 µM) desde el puerto A, provocando una disminución del consumo de oxígeno que se corresponde con la respiración asociada a la producción de ATP mitocondrial. Posteriormente, se inyectó FCCP (45 µM) desde el puerto B que, a la concentración adecuada, permite determinar la tasa de respiración máxima. Por último, se inyectó una mezcla de rotenona (10 µM) y antimicina A (25 µM), desde el puerto C, para inhibir totalmente la respiración mitocondrial, permitiendo así calcular el consumo de O₂ debido a la función no mitocondrial (**Esquema XVIII**).



Esquema XVIII. Perfil representativo de la tasa de consumo de oxígeno mediante el protocolo de MitoStress con la tecnología Seahorse. Cada punto representa una medida de OCR. Se muestra el momento de adición de los compuestos, y la determinación de varios parámetros; véase, *respiración no-mitocondrial* (OCR de procesos celulares no mitocondriales); *respiración basal* (OCR mitocondrial en condiciones normales); *respiración máxima* (pico máximo en el OCR bajo alta demanda de energía); *fuga de protones* (pérdida de eficiencia por filtrado de protones a través de la MMI); *producción de ATP* (OCR destinado a la generación de ATP en condiciones normales).

Puesto que el ajuste de la concentración de FCCP es muy importante para determinar una respiración máxima correcta, se realizó una puesta a punto previa con diferentes

concentraciones de FCCP. Se seleccionó 4.5 μM de concentración final, con la cual se alcanzó una mayor respiración mantenida en el tiempo en la condición control.

Tras el experimento, se fijaron las células con paraformaldehído 4 % y se tiñeron con DAPI 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (p/v) para normalizar el OCR por el número de células [ver apartado 8.3, Esquema VI]. De este modo se normalizaron los datos de cada pocillo por el número de células, expresándose como pmoles de oxígeno consumido por minuto y por 10.000 células.

A partir de los valores obtenidos, se pueden calcular los siguientes parámetros mediante la aplicación de las ecuaciones recogidas en la **Tabla II**:

Parámetro	Ecuación
Consumo de oxígeno no-mitocondrial	Tasa mínima de OCR después de inyectar rotenona/antimicina A
Respiración basal	(Última medida de OCR antes de inyectar oligomicina) – (OCR no-mitocondrial)
Respiración máxima	(Tasa de máxima de OCR después de inyectar FCCP) – (OCR no-mitocondrial)
Fuga de protones	(Tasa de mínima de OCR después de inyectar Oligomicina) – (OCR no-mitocondrial)
Producción de ATP	(Última medida de OCR antes de inyectar oligomicina) – (Tasa de OCR mínima después de inyectar oligomicina)
Respiración de reserva	(Respiración máxima) – (Respiración basal)

Tabla II. Parámetros y ecuaciones derivados de la medida de consumo de oxígeno en Seahorse. Se describen los puntos concretos en los que se ha medido el oxígeno y que se emplean para calcular los parámetros definidos en el texto.

Una breve descripción de estos parámetros se realiza a continuación:

- **Respiración no-mitocondrial:** es la tasa de oxígeno consumido por otros procesos celulares no asociados a la mitocondria, como la acción de las NADPH oxidasas.
- **Respiración basal:** es el consumo de oxígeno de la célula en condiciones basales, que incluye tanto el OCR asociado a producir ATP como la parte que se “escapa” en la fuga de protones.
- **Respiración máxima:** es la máxima respiración que la célula puede alcanzar tras incrementar la demanda energética basal, permitiendo el funcionamiento de la CTE a su máxima capacidad, al no existir un gradiente de protones limitante.

- La diferencia entre la respiración máxima y la basal es la **respiración de reserva**.
- **Producción de ATP:** se refiere al consumo de oxígeno destinado a producir ATP en condiciones basales.
- **Fuga de protones o *proton leak*:** es el remanente de la respiración basal que no está asociada a la producción de ATP. Se debe a la filtración de protones a través de la MMI, que disipa el gradiente y reduce la eficiencia de la fosforilación oxidativa.

Tasa de acidificación

Como se anotó al principio de este apartado, la tecnología Seahorse incluye también sondas que miden la concentración de protones presente en el medio, de manera que se puede estimar una tasa de acidificación extracelular (ECAR, del inglés *Extracellular Acidification Rate*). La principal contribuidora de acidificación del medio es la glucólisis, indirectamente a través de la conversión de piruvato en lactato, que libera H^+ al medio. Por otro lado, el TCA, que alimenta la CTE, produce CO_2 , que también puede acidificar el medio.

Aunque para el protocolo de MitoStress no se tiene en cuenta este parámetro, se empleará más adelante para determinar la tasa de producción de ATP [**apartado 16.2**]. No obstante, no está exento de valoración, ya que nos sirve como un control, puesto que los astrocitos PFKFB3 KO muestran una bajada en ECAR debido a una menor producción de lactato.

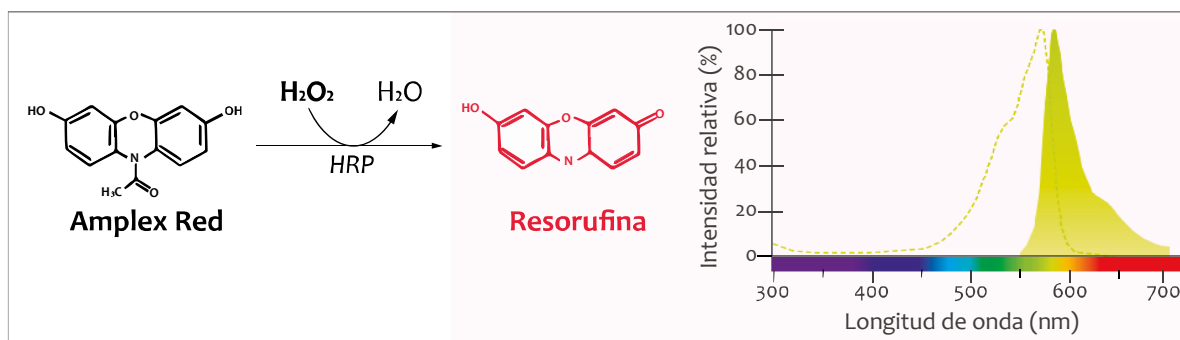
15. Análisis del estado REDOX celular

El estado redox celular hace referencia al equilibrio entre las formas reducidas y oxidadas de moléculas en una célula. Está relacionado con la transferencia de electrones entre estas moléculas y es esencial para procesos metabólicos y de señalización.

15.1. Detección de peróxido de hidrógeno mediante Amplex® Red

Para la detección de la producción de H_2O_2 extracelular de astrocitos en cultivo se utilizó la sonda comercial fluorescente Amplex®Red (ref. A12222, Thermo Fisher Scientific,). La determinación se realizó sobre células sembradas en placa de 96 pocillos. La sonda fluorescente Amplex®Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) no penetra en el interior celular, por lo que solo es posible medir el H_2O_2 extracelular. En presencia de la peroxidasa de rábano, el H_2O_2 se va a reducir a H_2O , y paralelamente con una estequiometría 1:1, el Amplex®Red se oxida a resorufina (7-Hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona), un compuesto fluorescente (**Esquema**

XIX). La longitud de onda de excitación y emisión de este compuesto es ~571 nm y ~585 nm, respectivamente.



Esquema XIX. Detección de H₂O₂ por Amplex® Red. En presencia de HRP, el reactivo Amplex® Red reacciona en una estequiometría de 1:1 con H₂O₂ para producir el compuesto fluorescente resorufina.

La cinética de oxidación de Amplex® Red se extrapoló como la medida de la liberación de H₂O₂ al medio de incubación, derivada de su producción en el interior celular. La cinética de fluorescencia de la sonda se evaluó a 37 °C en un lector de placas del modelo *Varioskan Flash* (Thermo Fisher), cada 30 minutos durante 2 horas. Las células se lavaron dos veces con PBS, para eliminar cualquier compuesto que pudiera interferir con la lectura, y se añadió KRPG suplementado con Amplex® Red 9,45 µM y peroxidasa de rábano 0,1 U/ml.

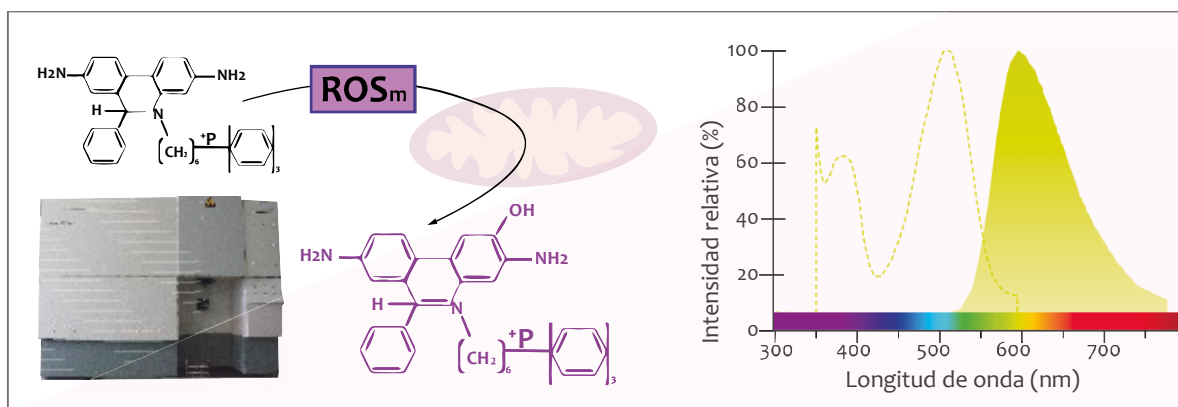
Las pendientes obtenidas se normalizaron por la concentración de proteínas en cada condición. Para ello se realizó un lavado con PBS tras el experimento, y se añadieron 20 µl de NaOH 0,1 M. Tras la lisis, se cuantificaron las proteínas mediante el método del BCA [ver **apartado 8.1**] añadiendo directamente 200 µl del reactivo sobre cada pocillo. No obstante, la comparación de datos absolutos extraídos de diferentes experimentos en condiciones similares demostró variabilidad intrínseca en los componentes del kit y, posiblemente, también la variabilidad biológica entre cultivos. Por ello, la representación y estadística de los datos obtenidos se realizó comparando la diferencia de valor en el número de veces con respecto a la condición control, a la que se asignó el valor de referencia de 1.

Para la determinación de producción de H₂O₂ de astrocitos y neuronas de cerebro adulto, tras la disgregación del tejido y separación inmunomagnética [ver **apartado 7**], se contaron las células y se sembraron 200.000 células en un volumen de 20 µl por pocillo y se añadieron 200 µl de la mezcla de reacción anterior. Las pendientes obtenidas se normalizaron por la concentración de proteínas en cada condición; para ello se reservaron células para lisar con NaOH 0,1 M y determinar la concentración de proteínas mediante el método del BCA [ver

apartado 8.1]. En este caso, la normalización y estadística se realizó comparando la diferencia en número de veces con respecto a la media de la condición control WT, a la que se asignó el valor 1.

15.2. Detección de ROS mitocondriales mediante MitoSox™

Para determinar los niveles ROS en la mitocondria, se utilizó la sonda comercial MitoSOX™ Red (ref. M36008, Thermo Fisher Scientific). Se trata de un compuesto permeable a las células vivas y que contiene un grupo catiónico que lo dirige selectivamente a las mitocondrias, donde se oxida esencialmente por la acción del superóxido, además de otras ROS mitocondriales. Puesto que, pese a ser un derivado del bromuro de etidio, no se ve reducida su capacidad intercalante, una vez se oxida, va a unirse al ADN mitocondrial, facilitando su detección en el interior celular (**Esquema XX**).



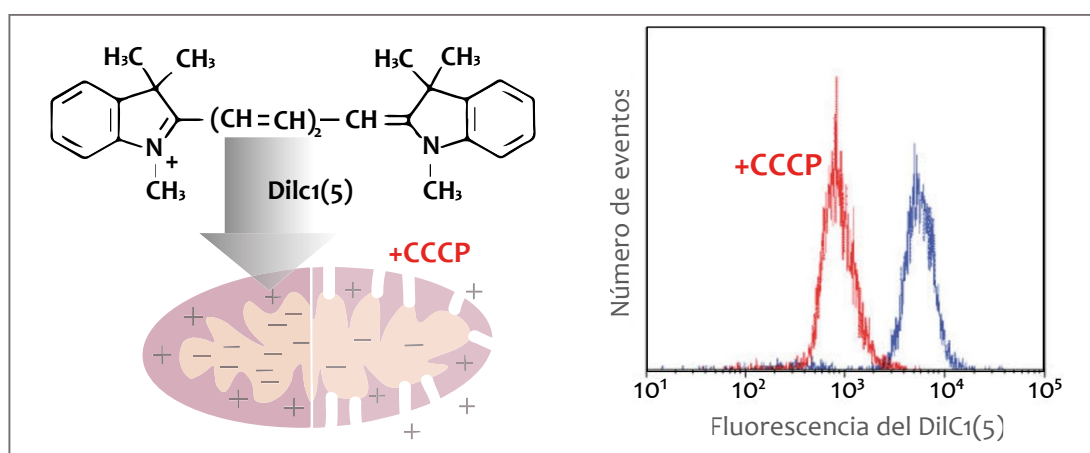
Esquema XX. Detección de ROS mitocondriales con la sonda MitoSOX™ mediante citometría de flujo. En la mitocondria, la oxidación de la sonda MitoSOX® da lugar a un derivado fluorescente que permite la detección de ROS mitocondriales de manera específica en el interior del orgánulo.

Para su determinación, primero se tripsinizaron las células con tripsina-EDTA 1X y se pipetearon en tubos FACs, especiales para citometría de flujo. Se centrifugaron y se resuspendió el pellet con KRPG suplementado con 2 μ M de la sonda MitoSOX™. Se incubó durante 30 minutos en un incubador sin atmósfera de CO₂ a 37 °C, en oscuridad. Posteriormente, se lavó el exceso de sonda con KRPG y los niveles de fluorescencia se midieron mediante citometría de flujo (FACScalibur, canal FL-3; programa CellQuest™, BD Biosciences). Para la análisis, se utilizaron 50.000 eventos por triplicado y por condición, en el programa *Paint-A-Gate™ PRO* (BD Biosciences). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia que estaba por encima de un control sin sonda. Los valores se expresaron según el número de veces con respecto a la condición control, a la que se asignó el valor de 1.

Esta determinación se realizó en paralelo con los experimentos de medición de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), para asegurarse de que las diferencias observadas en MitoSOX™ no se debían a diferencias en su incorporación a favor de potencial.

15.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante MitoProbe™ DilC₁

Para determinar el $\Delta\Psi_m$ se utilizó la sonda comercial fluorescente MitoProbe™ DilC₁(5) (ref. M34151, Thermo Fisher). El método se basa en la incubación con yoduro de 1,1',3,3',3',3'-hexametilindodicarbo-cianina (DilC₁(5)), un colorante que penetra en el citosol de las células y, debido a su carácter catiónico, se acumula principalmente en orgánulos con potenciales de membrana activos, como las mitocondrias, produciendo fluorescencia en el rojo lejano. Su intensidad de fluorescencia baja con la disminución del $\Delta\Psi_m$, por lo que a su medición se le acopla al tratamiento con el agente desacoplante mitocondrial, el cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona (CCCP), análogo del FCCP (**Esquema XXI**).



Esquema XXI. Detección del potencial de membrana mitocondrial mediante la sonda DilC₁(5). La sonda DilC₁(5) entra a favor de $\Delta\Psi_m$, pero su presencia en el interior mitocondrial disminuye al reducirse este potencial mediante el tratamiento con CCCP.

Para evaluar este parámetro, los cultivos de astrocitos se tripsinizaron y se incubaron en KRPG suplementado con la sonda DilC₁(5) durante 30 minutos a 37 °C, en oscuridad. Posteriormente, la monitorización de los niveles de fluorescencia se llevó a cabo mediante citometría de flujo (FACScalibur; programa CellQuest™, Biosciences) en condiciones basales. Una vez analizada, cada muestra se trató con el agente desacoplante CCCP 10 μ M para reanalizarse tras un mínimo de 15 minutos. Se tomaron 30000 eventos de cada condición en ausencia y presencia de CCCP.

Las intensidades de fluorescencia se cuantificaron con el programa *Paint-A-Gate™ PRO*. Los valores de $\Delta\Psi_m$ para cada muestra se calcularon mediante la diferencia de intensidad de fluorescencia detectada en condiciones basales menos la intensidad de fluorescencia de esa misma muestra tras el tratamiento con CCCP. Los valores se expresaron según el número de veces con respecto a la condición control, a la que asignó el valor de 1.

15.4. Determinación de niveles de NAD⁺ y NADH intracelulares

Para determinar los niveles de NAD⁺/NADH se empleó un kit comercial ref. MAK460 (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. El proceso se basa en una reacción cíclica de la lactato deshidrogenasa en la que el NADH formado reduce una sonda a un producto altamente fluorescente, cuya intensidad es proporcional a la concentración de NAD⁺/NADH de la muestra.

En primer lugar, se lavaron las células con PBS y se levantaron con tripsina-EDTA 1X del mismo pocillo se repartieron 500.000 células a dos tubos por separado, con PBS para lavar los restos de la solución de tripsinización; el resto de la muestra se lisó con NaOH y se utilizó para normalizar por mg de proteína. Las muestras se centrifugaron y cada tubo se homogenizó con el tampón de extracción de NAD⁺ y de NADH, por separado. Posteriormente, se calentaron a 60 °C durante 5 minutos. Se añadió un volumen 1:1 del tampón de extracción opuesto al anteriormente utilizado (100 μ l del de NAD⁺ o NADH según corresponda) y 20 μ l de tampón de ensayo. Se mezcló y se centrifugó a 14000 *g* durante 5 minutos; el sobrenadante se utilizó para la determinación en placas de 96 opacas de fondo plano (50 μ l/pocillo).

Se preparó la mezcla de reacción 2X, por muestra: 40 μ l del tampón, 1 μ l de enzima A, 1 μ l de enzima B, 10 μ l de lactato y 5 μ l de la sonda. Se añadieron 50 μ l de esta mezcla al mismo volumen de muestra y rápidamente se mezcló y se midió a tiempo 0 en un *Varioskan Flash* (Thermo Scientific) a una intensidad de 530 nm de excitación y 585 nm de emisión. La placa se incubó 10 minutos en oscuridad a RT y se repitió la medida después de 10 minutos. Para calcular la concentración de NAD⁺/NADH se llevó en paralelo una recta patrón de 0 (blanco) a 1 μ M de NAD⁺, de la cual se extrapoló la concentración de las muestras.

16. Análisis del estado energético celular

16.1. Determinación de los niveles de ATP intracelulares

La determinación de la concentración de los niveles de ATP total en cultivos de astrocitos se llevó a cabo con un kit comercial de bioluminiscencia (ref. A22066, Thermo Fisher Scientific). El ensayo se basa en el requerimiento de consumo de ATP de una luciferasa recombinante para la producción de luz a partir de luciferina.

En primer lugar, los cultivos de astrocitos se lavaron con PBS frío y se lisaron con HClO_4 0,3 M que se neutralizó añadiendo bicarbonato potásico (HKCO_3 0,5 M ~250 μl en 500 μl de HClO_4). Tras 15 minutos en hielo, las muestras se centrifugaron para decantar el precipitado formado y se utilizaron 10 μl de muestra para la determinación, siguiendo las instrucciones del fabricante, en un volumen final de 100 μl . La reacción se llevó a cabo en placas opacas y la luminiscencia se evaluó en un *Varioskan Flash* (Thermo Fisher), a una longitud de onda de 560 nm, cada 5 minutos durante 20 minutos, a 28 °C. En paralelo, se llevó una curva patrón con estándares de ATP (de 0 a 7,5 μM), de la cual se extrapola la concentración de las muestras.

16.2. Tasas de producción de ATP glucolítico y mitocondrial mediante Seahorse

Es posible estimar la tasa de producción de ATP a partir de la glucólisis y las mitocondrias utilizando la tecnología Seahorse. En células de mamíferos, la glucólisis y la OXPHOS generan la mayoría del ATP, y ambas vías contribuyen a la acidificación, como ya se comentó. La tecnología Seahorse mide simultáneamente el ECAR y el OCR. Al obtener estos datos en condiciones basales y tras la adición en serie de los inhibidores mitocondriales oligomicina y rotenona/antimicina A, se pueden estimar las tasas de producción de ATP mitocondrial (mitoATP) y glucolítico (glicoATP) específicas de la vía. Para ello, el protocolo es el mismo al explicado en el **apartado 15**, exceptuando las inyecciones de los compuestos. En este caso, se añadió oligomicina (2,5 μM) desde el puerto A y rotenona (10 μM) junto con antimicina A (2,5 μM) desde el puerto B.

Tras el experimento, las ecuaciones utilizadas para transformar los datos de OCR y ECAR en tasas de producción de ATP se describen en **Tabla III**.

A continuación, se definen algunos de los conceptos nuevos que aparecen en la tabla y que es conveniente conocer para entenderla:

- **“Tasa de liberación de protones”** o **PER** (del inglés, *Proton Efflux Rate*): el número de H⁺ exportados por las células a lo largo del tiempo.
- **Factor de Tamponado** (BF, del inglés *Buffer Factor*): permite relacionar directamente el PER con el ECAR si se emplea un medio con un factor conocido. En este caso equivale a 2,5.
- **Volumen de la microcámara**: equivalente a 5,65 µl para las placas XFe24.
- **Factor de escala de volumen** o *kvol*: se trata de un valor que escala el volumen físico al efectivo, dado que el sistema de medición es semicerrado. Para XFe24 equivale a 1,19.
- **Factor de contribución de CO₂** (CCF): aportación de H⁺ por cada O₂ mitocondrial consumido. Para el XFe424 equivale a 0,6.
- **Ratio P/O**: número de moléculas de ADP fosforiladas en ATP por átomo de O reducido por un par de electrones que fluye a través de la CTE mitocondrial, calculado como 2,75.

Parámetro	Ecuación
Tasa de producción de glucoATP (pmol ATP/min)	glucoPER (pmol H ⁺ /min)
glucoPER (pmol H⁺ /min)	PER (pmol H ⁺ /min) – mitoPER (pmol H ⁺ /min)
PER (pmol H⁺ /min)	ECAR (mpH/min) x BF (mmol H ⁺ /L/pH) x Volumen microcámara (µL) x Kvol
mitoPER (pmol H⁺ /min)	mitoOCR (pmol O ₂ /min) x CCF (pmol H ⁺ /pmol O ₂)
mitoOCR (pmol O₂ /min)	OCR basal (pmol O ₂ /min) – OCR (Rotenona/Antimicina A) (pmol O ₂ /min)
OCR_{ATP} (pmol O₂ /min)	OCR basal (pmol O ₂ /min) – OCR Oligo (pmol O ₂ /min)
Tasa de producción de mitoATP (pmol ATP/min)	OCR _{ATP} (pmol O ₂ /min) * 2 (pmol O /pmol O ₂) * P/O (pmol ATP/pmole O)

Tabla III. Ecuaciones empleadas para calcular las tasas de producción de ATP mitocondrial y glucolítico. Las ecuaciones relacionan el OCR y el ECAR con la tasa de producción de ATP por la glucólisis y la OXPHOS, mediante equivalencias con el número de H⁺ producidos y de átomos de O consumidos en las mismas.

17. Análisis del comportamiento espontáneo del ratón

Las pruebas de comportamiento se realizaron con ratones macho de aproximadamente 5 y 13 meses de edad, así como a hembras de 5 meses. Ambos sexos se evaluaron por separado. Cada prueba se precedió de un período de aclimatación de ~1 hora en las salas habilitadas para cada ensayo, realizado en la misma franja horaria durante su ciclo de luz (9 pm–14 pm). Para la ejecución de las pruebas también se tuvo en cuenta el descanso de los ratones, considerando la distancia y alternancia en el tiempo entre las diferentes pruebas. Antes de cada prueba y entre animales, se limpió cuidadosamente el aparato correspondiente con etanol al 70% para eliminar cualquier estímulo olfativo.

En muchas de las pruebas se utilizó un núcleo ANY-box® (ANY-Maze, Stoelting Europe, **Esquema XXII-A**). Este se compone de una base sólida de color gris, sobre la que encajan cubículos con diferentes formatos según la prueba a realizar, un sistema ajustable de sujeción perpendicular para sostener la cámara, y unos sensores laterales con rayos infrarrojos para detectar ciertos movimientos del animal. Tanto los sensores como la cámara están conectados a una interfaz ANY-Maze® (ANY-Maze, Stoelting Europe) para registrar y analizar todos los parámetros valorados en cada ensayo.

Salvo para la prueba de coordinación motora con Rotarod, se empleó el software ANY-maze® (ANY-Maze, Stoelting Europe) para analizar los parámetros estudiados.

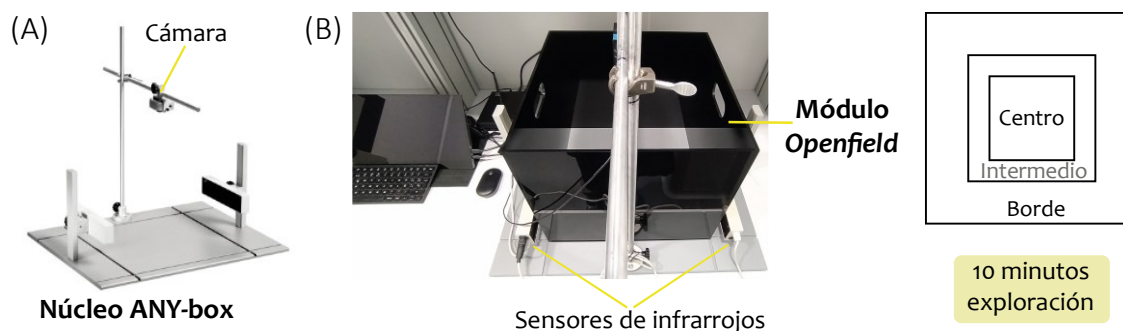
17.1. Evaluación de la exploración mediante la prueba de campo abierto (*Openfield*)

La prueba de campo abierto (*Openfield*) se ha utilizado ampliamente para valorar el comportamiento exploratorio, así como en la evaluación de comportamientos emocionales relacionados con la ansiedad (Seibenhener y Wooten, 2015). La conducta espontánea de los roedores demuestra una clara tendencia a evitar entornos abiertos, iluminados y desconocidos, características inherentemente presentes en esta prueba.

Para la realización del *Openfield* se colocó, sobre el núcleo ANY- box®, un cubículo de plexiglás con paredes opacas, indetectables para el haz de rayos infrarrojos, que delimita una superficie de 40 cm x 40 cm x 35 cm (ancho, profundidad y altura). Los ratones tuvieron acceso a toda la superficie, desconocida para ellos, durante 10 minutos (**Esquema XXII-B**).

Con esta prueba se monitorizó la distancia total recorrida, el número de levantamientos (detectados por los sensores infrarrojos) y el tiempo estático (*freezing*) como parte de la

capacidad locomotora general. La tigmotaxis, o tendencia de los ratones a permanecer cerca de las paredes, se utilizó como medida del comportamiento ansiógeno. Para ello, se analizó el movimiento a lo largo de toda la superficie dividiendo la pista en tres zonas, utilizando el software ANY-maze®: borde (1020 cm²), centro (256 cm²) e intermedio (el área restante).



Esquema XXII. Núcleo ANY-box y prueba del Openfield. Se muestra el núcleo ANY-box (A) y el módulo empleado para el Openfield, con los sensores de infrarrojos que detectan los levantamientos (B). A la derecha se observa la división virtual que se empleó para el análisis de la exploración.

17.2. Evaluación de la memoria mediante el reconocimiento de nuevos objetos

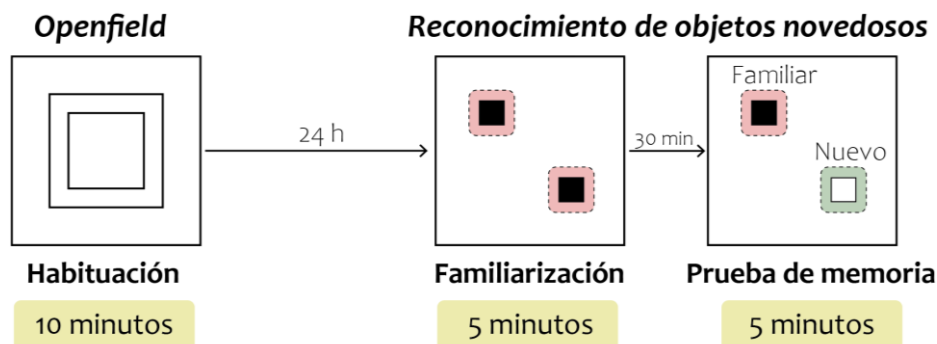
La prueba de reconocimiento de nuevos objetos o NOR (del inglés, *Novel Object Recognition*) es una prueba ampliamente utilizada para evaluar la memoria, aunque existen numerosas variantes, ampliamente descritas en la bibliografía (Antunes y Biala, 2012). En general, todas se componen de tres fases: habituación, familiarización y prueba.

Para evaluar la memoria a corto plazo, considerando la habituación como el proceso por el cual el animal se aclimata a la zona, se utilizó la prueba de *Openfield*, realizándose siempre 24 horas antes de llevar a cabo la prueba de reconocimiento de objetos (**Figura XXIII**).

Para la fase de familiarización, se situaron dos objetos de igual forma y color, equidistantes y en diagonal, dentro del núcleo ANY-box® con el mismo cubículo que para la prueba anterior, y se dejó al animal explorando durante 5 minutos. Una vez finalizada esta fase, se dejó descansar al animal en su jaula durante 30 minutos. Tras finalizar el descanso, se volvió a introducir al animal en el mismo cubículo, pero cambiando uno de los objetos por otro de igual forma y distinto color. Se le permitió explorar 5 minutos y se monitorizó la preferencia por ambos objetos en esta fase.

La capacidad para identificar el nuevo objeto se evaluó mediante el **índice de discriminación**, calculado como la diferencia entre el tiempo de exploración para el objeto novedoso menos

el tiempo empleado para explorar el objeto familiar conocido, dividido por el tiempo total de exploración de ambos objetos. Este valor oscila entre +1 y -1: un valor positivo sugiere mayor tiempo dedicado al objeto nuevo y un valor negativo indica más preferencia por el objeto familiar. La exploración del objeto se registró cuando el ratón se acercaba a su periferia ($\leq 1,5$ cm) con el hocico hacia el objeto, excluyendo girarse o sentarse sobre él.



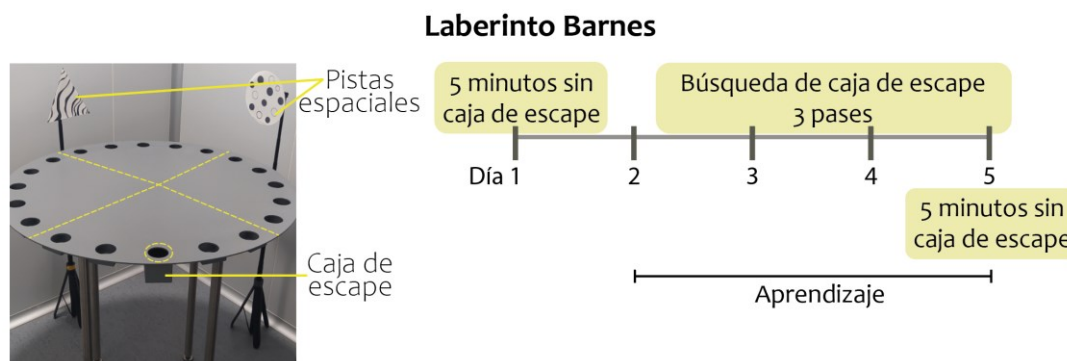
Esquema XXIII. Esquema de la prueba de Reconocimiento de Objetos Novedosos o NOR. Esta prueba se realiza 24 horas después del Openfield y consta de una fase de familiarización con dos objetos iguales y tras 30 minutos de descanso, se realiza la prueba de memoria, cambiando el color de uno de los objetos.

17.3. Evaluación de la memoria espacial mediante el laberinto de Barnes

El laberinto de Barnes es, conceptualmente, similar al laberinto acuático de Morris, pero menos estresante y más sencillo de realizar. El sistema consiste en una plataforma circular gris, de 120 cm de diámetro, elevada 90 cm sobre el suelo; a lo largo de su perímetro hay 20 agujeros espaciados uniformemente (**Esquema XXIV**). El laberinto tiene una caja de escape extraíble que puede colocarse debajo de uno de estos agujeros y llenarse con el lecho del animal. Se colocaron figuras en blanco y negro de distinta forma como pistas visuales espaciales, enfrentadas dos a dos (formando un cuadrado alrededor del laberinto). En todas las sesiones, los animales se aclimataron previamente en oscuridad, mientras que las pruebas se realizaron bajo iluminación para aumentar la aversión del ratón por la plataforma.

La prueba constó de tres fases. Primero, la fase de habituación, donde se dejó a los animales explorar la plataforma libremente durante 5 min, un día antes de las sesiones de entrenamiento, sin colocar el cajetín de escape. Posteriormente, los animales se entrenaron para permitirles aprender dónde se encontraba el agujero de escape. El ratón se situó sobre la plataforma durante un máximo de 5 minutos o hasta que se introdujese en el cajetín del agujero de escape. El proceso se repitió durante 4 días, 3 sesiones por día y, como elemento de atracción, se colocó el lecho del animal en el cajetín. Finalmente, se realizó la prueba de

memoria espacial, en la cual se retiró la caja de escape y se permitió al animal explorar el laberinto durante 5 minutos. Esta sesión se llevó a cabo al concluir el último día de entrenamiento para evaluar la capacidad de aprendizaje.

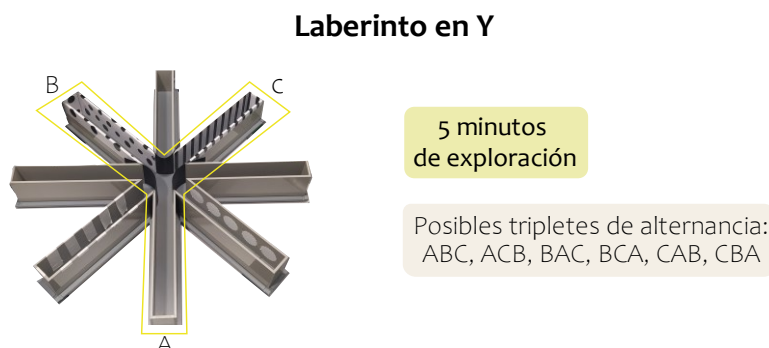


Esquema XXIV. Estudio de aprendizaje y memoria espacial en Laberinto Barnes. Laberinto con caja de escape y pistas visuales. Tras una habituación de 5 minutos, se entrenó al animal 4 días, añadiendo una caja de escape con su lecho. El último día se retiró y se evaluó el aprendizaje como la preferencia por el cuadrante de escape.

Para llevar a cabo el análisis, la plataforma se dividió virtualmente en cuatro cuadrantes, cada uno con cinco agujeros y se cuantificó, entre otros parámetros, el tiempo que pasaban en el cuadrante que anteriormente contenía la caja de escape (Lapresa *et al.*, 2022).

17.4. Evaluación de memoria de trabajo mediante el laberinto en Y (Y-maze)

Como medida de memoria de trabajo se evaluó la alternancia espontánea en un laberinto en “Y” (Jiménez-Blasco *et al.*, 2020). Para ello, se empleó un laberinto radial de plexiglás con ocho brazos al cual se le bloquearon cinco de ellos, dejando 3 en forma de “Y”. Cada brazo presenta 30 cm de largo, 5 cm de ancho y 12 cm de alto. La cámara del ANY-maze se situó encima, perpendicular al centro de la estructura (**Esquema XXV**).



Esquema XXV. Alternancia espontánea en laberinto en Y o Y-maze. Laberinto radial con 3 brazos en forma de 'Y'; se registraron las entradas a los brazos durante 5 minutos y se calculó el porcentaje de alternancia como indicador de la memoria de trabajo. Se muestran los posibles tripletes de alternancias correctas.

Los animales se colocaron al final del brazo A y se les permitió moverse libremente a través del laberinto durante 5 minutos (Yan *et al.*, 2017). Se contó una entrada del brazo cuando las patas traseras del ratón estaban completamente dentro de este. La alternancia espontánea se definió como el número total de tríadas de entradas secuenciales en tres brazos diferentes (ABC, ACB, BAC, BCA, CAB, CBA). El porcentaje de alternancia se calculó como la relación entre las alternancias reales y las posibles (equivalente al número total de entradas menos dos) sobre 100.

17.5. Evaluación de la exploración en la caja de agujeros (*Hole board*)

La prueba de exploración en la caja con agujeros o *Hole board* se utilizó como una variante del *Openfield*, para profundizar en el comportamiento exploratorio del animal. Al módulo opaco del *Openfield* se le añadió una estructura metálica con 16 agujeros repartidos homogéneamente por toda la superficie (**Esquema XXVI**). Se ajustó la distancia de los sensores infrarrojos para poder detectar las exploraciones del ratón, que consistían en la introducción de la cabeza en alguno de los agujeros. Se introdujo el animal en la caja y se le dejó explorar durante 5 minutos y, posteriormente se analizó la distancia recorrida y el número de exploraciones.



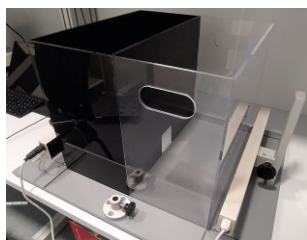
Esquema XXVI. Evaluación de la exploración en la caja de agujeros o *Hole Board*. Se dejó al animal caminar libremente durante 5 minutos sobre una estructura metálica añadida al módulo del *Openfield*, con 16 agujeros potencialmente explorables.

17.6. Evaluación de los niveles de miedo/ansiedad en la caja Blanca/Negra

Para completar la evaluación del miedo/ansiedad de los ratones, se realizó la prueba de la caja Blanca/Negra o caja Blanca/Negra. Esta prueba consistió en situar al animal ante dos estancias, una luminosa y de paredes transparentes, en la cual se siente más expuesto y estresado, y una más oscura y de paredes opacas, en la que se encuentra más protegido (**Esquema XXVII**). Para realizar esta prueba, se colocó un cubículo de plexiglás con una separación interna de los dos habitáculos, uno opaco y otro transparente, con una entrada de paso para permitir al animal

cambiar de estancia. Se introdujo al animal en la parte transparente y se le dejó explorar durante 10 minutos. Se evaluó el tiempo y la distancia recorrida en ambas estancias.

Caja Blanca/Negra



Comienzo en parte transparente

10 minutos exploración

Esquema XXVII. Evaluación de miedo/ansiedad en Caja Blanca/Negra o Black&White. Se dejó al animal en un cubículo con dos estancias separadas, una opaca y otra transparente e iluminada, con una zona de paso entre ambas. Se registraron el tiempo, distancia recorrida y levantamientos durante una exploración de 10 minutos.

17.7. Evaluación de la coordinación motora mediante la prueba de Rotarod

La coordinación motora de los ratones se analizó mediante la monitorización de su equilibrio sobre un cilindro rodante con una velocidad acelerada. Para ello, se utilizó el sistema Rotarod (Modelo 47600, Ugo Basile Srl) que subdivide el cilindro rodante en 5 carriles para la evaluación simultánea de hasta 5 ratones (**Esquema XXVIII**).

ROTAROD

Entrenamiento

- 1- Velocidad constante
- 2- Aceleración constante 4,5
- 3- Aceleración constante 4,5

Prueba

- 4- Aceleración constante 4,5



3 pases
máximo 300 s/pase

Descanso 15-20 minutos
por pase

Esquema XXVIII. Evaluación de la coordinación motora mediante la prueba de Rotarod. El Rotarod consta de un cilindro rodante con 5 carriles. Se realizaron 3 días de entrenamiento, incluyendo una habituación y pruebas con incremento de velocidad. Se registró la duración máxima en segundos (hasta 300 s) de permanencia, penalizando la pasividad (ver texto).

Antes de la evaluación de la prueba, los ratones se entrenaron durante 3 días consecutivos, siendo el primer día una habituación en la que el cilindro giraba a velocidad constante de 4 revoluciones por minuto, sin aceleración. Se realizaron 3 intentos separados con un período de descanso de 15-20 minutos. Los 2 días posteriores, se probaron las condiciones experimentales del ensayo como parte del entrenamiento, que consistieron en someter a los animales a un incremento de velocidad desde 4 a 25 revoluciones por minuto, con una

aceleración constante de 4,5 durante 300 segundos, alcanzándose la velocidad máxima a los 270 segundos.

Tras dos días de descanso, los animales se sometieron a la prueba definitiva. Se penalizó la *pasividad* por parte de los ratones, entendida como la rotación sobre sí mismos agarrándose al cilindro en movimiento. En estos casos la prueba se consideró finalizada cuando el ratón acumuló 3 rotaciones totales a lo largo de la prueba.

El resultado se expresó en segundos según el tiempo de resistencia a la caída o de duración de la prueba. Para el análisis de los resultados, se realizó la media de los 3 intentos realizados según la resistencia a la caída siendo el máximo 300 segundos.

18. Perfusion de los animales y análisis inmunohistoquímico

Para realizar un análisis básico del estado y cantidad de los principales tipos celulares del cerebro, se decidió llevar a cabo una inmunohistoquímica de cortes de cerebros de animales adultos. La perfusión y fijación son esenciales para preservar la estructura y propiedades originales del tejido. Esto previene la autólisis celular y la alteración y retracción del tejido, manteniendo así su integridad (Gage et al., 2012).

18.1. Perfusion de los animales, fijación y crioprotección del tejido cerebral

Los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal con una mezcla en proporción 1:3 de clorhidrato de xilacina (Rompún®, Bayer) y ketamina (Imalgène®, Merial). Dicha mezcla se administró de manera proporcional al peso corporal de los animales (1 ml/Kg peso corporal). A continuación, se procedió a la perfusión del animal vía aórtica.

En primer lugar, se expuso el corazón y, para evitar la coagulación de la sangre, se inyectó 0,1 ml de heparina sódica a través del ventrículo izquierdo. Seguidamente, se conectó a la aorta una bomba peristáltica a través de una cánula y se bombeó solución salina (NaCl 0,9 %) durante un minuto para lavar el sistema cardiovascular y reducir así la posterior autofluorescencia de los vasos y células sanguíneas. Pasado este tiempo, se administró Solución Fijadora [ver **apartado 3**] durante 15 minutos (Bobo-Jiménez et al., 2017).

Una vez fijado el tejido, se procedió a la extracción del cerebro de manera cuidadosa para no dañarlo y se seccionó sagitalmente empleando una matriz. Para una mejor fijación se sumergieron los encéfalos en solución fijadora durante 24 h a 4 °C. Se realizaron lavados

seriados con tampón fosfato (PB) 0,1 M RT y uno O.N a 4 °C. Posteriormente, el tejido fue crioprotegido por inmersión en soluciones seriadas de concentración ascendente de sacarosa en PB (10 %, 20 % y 30 % (p/v)), hasta la saturación del tejido. Este proceso es esencial, ya que permite la congelación del tejido sin que se formen cristales que lo dañen (Porteros et al., 2007). A continuación, los cerebros se encastraron en solución OCT® (Tissue-Tek®, Sakura), posicionando el criomolde horizontalmente en una superficie metálica enfriada con nitrógeno líquido para su congelación gradual y se almacenaron a -80 °C.

18.2. Obtención de secciones cerebrales e inmunohistoquímica

Obtención de secciones cerebrales

Los cerebros se cortaron en secciones seriadas de 10, 20 y 40 µm (Criostato Leica CM 1050 Ag Protect; Leica Biosystems). Los cortes de 10 y 20 µm se montaron directamente sobre portaobjetos en el momento del seccionado, y se guardaron a -20 °C; mientras que los cortes de 40 µm se realizaron en flotación y se almacenaron a 4 °C.

Inmunohistoquímica

En este trabajo se han empleado secciones de 40 µm, por lo que la inmunohistoquímica se realizó en flotación. En primer lugar, las secciones se lavaron 3 veces durante 10 minutos a RT y en agitación orbital constante con PB 0,1 M. Para eliminar la autofluorescencia de grupos aldehído presentes en el tejido, las secciones se sometieron a un pretratamiento con borohidruro sódico (5 mg/ml) disuelto en H₂O destilada durante 30 minutos a RT y con luz directa y, posteriormente, se lavaron de nuevo con PB (3x5 min). A continuación, se realizó la incubación con los anticuerpos primarios en PB 0,1 M con Tritón X-100 al 0,2 % y suero fetal de cabra al 10 % (v/v) durante 72 h a 4 °C con agitación orbital. Seguidamente, se lavaron las secciones (3x10 min) con PB y se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios en PB durante 2 h a RT y oscuridad. Se lavaron los cortes de nuevo con PB (2x10 min) y se realizó la tinción de los núcleos con DAPI 0,1 µg/ml en PB durante 10 minutos a RT en oscuridad. Se realizaron los últimos lavados con PB (3x5 min) y se llevó a cabo el montaje de los cortes sobre portaobjetos gelatinizados. Una vez montados y secos se sellaron con el medio de montaje Fluoromount TM® (Sigma) y un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas. Los anticuerpos utilizados se detallan en la siguiente tabla (**Tabla IV**).

Anticuerpo	Dilución	Ref.	Casa comercial
GFAP	1/500	G6171	Sigma
IBA1	1/500	019-19741	Wako
MAP2	1/500	ab11268	Abcam
RATÓN Cy™2	1/1000	115-225-003	Jackson
CONEJO Cy™3	1/1000	111-165-003	Jackson

Tabla IV. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la inmunohistoquímica. Listado de anticuerpos primarios (en azul) y secundarios (en naranja), incluyendo la dilución empleada y la casa comercial con su referencia.

18.3. Adquisición y análisis de imágenes

Para la evaluación de las secciones sagitales de los hemisferios con detalle, se empleó un microscopio confocal invertido spinning disk (*ANDOR DragonFly NikonTi2-E*) y el software de adquisición *Fusion 2.2*. Se tomaron micrografías desde el control del microscopio de planos focales de 0,5 μm abarcando todo el espesor celular hasta la pérdida del foco con el objetivo de 10X y 40X. Las condiciones de adquisición de las imágenes para cada marcaje se detallan en la **Tabla V**. Todas las imágenes adquiridas por microscopia confocal se procesaron y, tras la deconvolución, se analizaron mediante el uso del software libre *FIJI (ImageJ 1.48u4)*, en formato *tiff*. Se realizó la proyección de los distintos planos focales mediante la opción de *Z Project* en cada uno de los canales adquiridos; con un total de 47 planos para la inmunohistoquímica de neuronas con el objetivo de 10X y un total de 39 planos con el objetivo de 40X y, en la inmunohistoquímica de astrocitos y microglia, un total de 47 planos con ambos objetivos.

	λ excitación (nm)	λ emisión (nm)	Potencia láser (%)	Tiempo de exposición (ms)
DAPI	405	445-46	30	500
MAP2-Cy2	488	521-38	40	400
GFAP-Cy2	488	521-38	30	500
IBA1-Cy3	561	594-43	20	300

Tabla V. Condiciones de adquisición de imágenes en confocal invertido spinning disk para cada canal. Se indica la λ de excitación y emisión (nm) y, la potencia de los láseres (%) y el tiempo de exposición (ms) empleados para recoger los marcajes del DAPI, Cy2 y Cy3.

La cuantificación de los diferentes parámetros analizados se realizó en las micrografías en *Z Project* de tres regiones diferentes de la CA1 de cada hipocampo de tres cortes sagitales

seriados por ratón y teniendo en cuenta las escalas correspondientes a cada objetivo usado; 40X (0,2551 $\mu\text{m}/\text{píxel}$) o 10X (1,2004 $\mu\text{m}/\text{píxel}$).

Para la determinación del espesor de la capa CA1 se seleccionó el canal del DAPI ajustando al mismo *Brillo/Contraste* (valor mínimo 181/valor máximo 1335) cada imagen. Se delimitaron y cuantificaron 5 medidas trazadas en la capa de núcleos de la CA1 a 40X con la opción de *Straight line* por imagen.

El análisis del porcentaje de área ocupado por MAP2, GFAP e IBA1, se realizó mediante la herramienta *Threshold Huang* y seleccionando un área determinada del CA1 a 40X (MAP2 y GFAP) y en todo el hipocampo a 10X (IBA1). Los *Threshold* se realizan con las imágenes en *Z Project* convertidas a 8 bits. De este modo se delimitó la morfología celular deseada cuantificando así el número de píxeles que ocupan el área determinada.

Las imágenes fueron adquiridas y procesadas para analizar la intensidad media de fluorescencia, ajustándose las intensidades mínima y máxima de *Brillo/Contraste*. Se utilizaron los valores 315/2107, 160/3739 y 100/1902 para MAP2, GFAP e IBA1, respectivamente. Todas las imágenes originales en la proyección Z se obtuvieron y analizaron a 16 bits. Se analizó la intensidad de las imágenes de 40X de la CA1 del MAP2 Y GFAP y de 10X del hipocampo de IBA1.

El número y morfología celular se evaluó a partir del *Threshold Default* para GFAP y *Threshold Intermodes* para IBA1. Los *Threshold* se realizan con las imágenes en *Z project* convertidas a 8 bits. Se seleccionó la herramienta *Analyze particles*, donde se delimitó un tamaño de escala de 18-infinito para GFAP y de 30-infinito para IBA1. La escala se ajustó para recoger un mayor número de células individualizadas en el campo y, posteriormente, se analizaron los parámetros de *Roundness* y *Solidity* para GFAP e IBA2, respectivamente, adaptándose a la morfología particular de ambos tipos celulares.

19. Análisis metabólico en muestras de cerebro de ratón adulto

Animales adultos (13 meses de edad) se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el cerebro, separando los hemisferios por la línea media y se congelaron rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido. La porción más medial del hemisferio derecho (aproximadamente 70 mg) de un total de 6 animales por genotipo (WT y PFKFB3 KO), se envió

a la empresa especializada *Metabolon* (Morrisville, EE. UU.), con el fin de realizar un estudio metabolómico no dirigido. El estudio se realizó mediante el acoplamiento en tándem de cromatografía líquida de alta resolución a espectrometría de masas. Las muestras se procesaron, se identificaron los datos primarios y se realizó un posterior filtrado de los datos, normalizándolos para su comparación relativa y control de calidad. Una vez normalizados los registros, mediante una transformación a su correspondiente logaritmo para comprimir la escala y facilitar su visualización y análisis, se identificaron niveles de metabolitos significativamente diferentes. Estos valores son ya proporcionados por la empresa.

En el estudio se detectaron un total de 751 metabolitos distintos. Empleando la herramienta en línea *MetaboAnalyst 5.0*, se realizó el análisis de componentes principales, la matriz de correlación de metabolitos y el mapa de calor de los metabolitos aumentados o disminuidos (se incluyeron los metabolitos que mostraban cambios con un p -valor $\leq 0,1$, diferenciándose de los significativamente diferentes, con p -valor $\leq 0,05$). Para ello, se le proporcionó al programa un archivo csv con el nombre de los compuestos y los valores normalizados de cada uno de estos de los 6 animales por condición.

Para la realización del Volcano Plot de la abundancia relativa se transformaron los incrementos (de los metabolitos registrados del PFKFB3 KO con respecto al WT; calculados también por *Metabolon*) a \log_2 y se enfrentaron frente al \log_{10} de los p -valor correspondientes.

Se realizó también una matriz de enriquecimiento de las rutas (Wieder *et al.*, 2021) para identificar la regulación significativa de conjuntos predefinidos de metabolitos en relación con una lista de referencia. Se empleó la misma lista empleada por *Metabolon*, compuesta por los 751 metabolitos detectados y categorizados en diferentes rutas metabólicas. Esta clasificación asigna cada metabolito a una única ruta principal. De nuevo, se enfrentó el \log_2 de los *enriquecimientos* frente a \log_{10} de los p -valor. El parámetro de *enriquecimiento* es el resultado de la siguiente ecuación:

$$\text{Enriquecimiento} = \frac{\binom{k}{m}}{\binom{n-k}{N-m}}$$

k = metabolitos significativamente alterados en una ruta

m = metabolitos totales detectados en una ruta

n = metabolitos significativamente alterados totales

N = metabolitos detectados totales

20. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el software *Graph PadPrism 8.4.2*. Se aplicaron distintas pruebas estadísticas dependiendo de los datos a analizar. En cada resultado descrito, se especificó el número de muestras/imágenes/animales y las características de la prueba empleada en el pie de figura. En todos los casos, se consideró un **p<0,05 como estadísticamente significativo**, aunque en los gráficos se indica de forma numérica el p-valor siempre que sea $\leq 0,1$.

Para la mayoría de los experimentos se aplicó la prueba estadística *t de Student* no pareada de dos colas, puesto que se realizó una comparación entre dos grupos experimentales de varianzas no diferentes. Excepcionalmente se empleó la *t de Student* de una cola para los experimentos de *in vivo* que pretendían reflejar resultados observados *in vitro*. Para la comparativa de varios grupos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Para los experimentos en cultivo que, por su características metodológicas o notable variabilidad interexperimental, se normalizaron los valores con respecto a cada WT del mismo día del experimento, se empleó la prueba no paramétrica *U de Mann-Whitney*, al no poder asumir homogeneidad de varianzas ni una distribución normal de la condición control (Curtis *et al.*, 2018).

En el estudio metabolómico, se optó por utilizar la prueba *t de Welch* siguiendo la recomendación de *Metabolon*. Esta prueba es paramétrica, pero, a diferencia de la *t de Student*, no asume homogeneidad en las varianzas, convirtiéndola en la opción preferida cuando existe la posibilidad de que las varianzas difieran entre grupos. Esta elección se basa en la experiencia cotidiana de la empresa en el tratamiento de datos metabolómicos, proporcionando un método estadístico con mayor robustez (Delacre, Lakens y Leys, 2017). Sin embargo, no existen grandes diferencias entre el uso de ambas pruebas para los metabolitos detectados, manteniéndose el p-valor $\leq 0,05$ y p-valor $\leq 0,1$ (según corresponda) igual en los dos, a excepción de tres metabolitos* cuya relevancia en términos estadísticos disminuye con la *t de Welch*.

Es importante destacar que, debido a las mínimas diferencias en el número y magnitud de cambios en los metabolitos detectados en la metabolómica, en análisis se basó únicamente en el *p-valor* para determinar la significancia estadística, a pesar de que el q-valor es

comúnmente usado en estos contextos para reducir la tasa de falsos descubrimientos. Sin embargo, nuestro enfoque se centra en la identificación individual de los metabolitos, evaluando la relevancia de sus variaciones en función de hallazgos anteriores, tanto en cultivos celulares como en estudios *in vivo*.

*Estos son la alanina, que pasaría a un p-valor $\leq 0,05$ y los metabolitos N-trimetil-aminovalerato y N-formilmetionina, que pasarían a un p-valor $\leq 0,1$.

RESULTADOS

I. Comprobación del modelo *knockout* condicional de PFKFB3 en cultivo primario de astrocitos

Para determinar la importancia de la glucólisis y, más concretamente, de la PFKFB3 astrocítica en el metabolismo cerebral, se utilizó un modelo murino KO condicional cedido generosamente por el Prof. Peter Carmeliet (Lovaina, Bélgica), que presenta dos sitios *LoxP* flanqueando los exones 2 y 6 del gen endógeno de la *Pfkfb3* (*Pfkfb3^{LoxP/LoxP}*).

Desarrollo de una estrategia para el estudio de la relevancia de la PFKFB3 en cultivo primario de astrocitos

Con objeto de eliminar la expresión de PFKFB3 en cultivos primarios de astrocitos corticales obtenidos de ratones *Pfkfb3^{LoxP/LoxP}* se empleó un adenovirus 5 que expresaba la recombinasa Cre bajo un promotor ubicuo citomegalovirus. Los astrocitos en cultivo necesitan al menos 12 días en cultivo (DIV12) para su diferenciación máxima (Almeida y Medina, 1998) y según las condiciones de cultivo y siembra empleadas, la confluencia puede ser alcanzada ese mismo día. Los astrocitos se utilizaron el DIV15, momento en el que llevan al menos 3 días en estado confluyente, tras una renovación del medio de cultivo el día anterior. De este modo, se asegura una completa diferenciación de los cultivos y su estado metabólicamente similar entre los diferentes experimentos.

Para comprobar el evento de recombinación en muestras de DIV15, se realizó una PCR con dos cebadores que flanqueaban el fragmento de escisión putativo, situado entre los dos sitios *LoxP* (**Figura 1**). En este caso, las células se transdujeron con una concentración viral de 10 genoma viral por célula, siguiendo la recomendación de otros laboratorios. A partir de ahora, se denominará PFKFB3 KO (o “KO” para simplificar) a la condición KO de *Pfkfb3* en astrocitos.

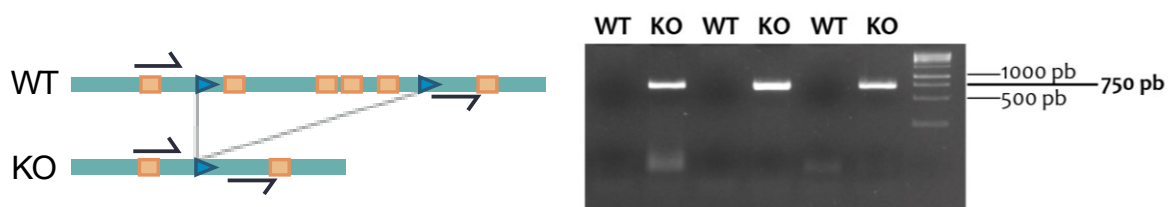


Figura 1. Comprobación del evento de recombinación. Electroforesis de los fragmentos amplificados en n=3 cultivos independientes. Solamente en los astrocitos *knockout* para PFKFB3 (KO) se observa una banda cercana a 750 pb, que refleja el fragmento génico mantenido tras la recombinación con la recombinasa CRE.

Para ajustar la concentración de adenovirus y asegurar el máximo número de células

transducidas, se evaluó la eficiencia de diferentes dosis de vector viral mediante inmunodetección de la proteína PFKFB3 por *Western Blot* (Figura 2). Se seleccionó una dosis de 15 genomas virales por célula, concentración con la que se consiguió una disminución máxima de los niveles de PFKFB3, sin exponernos a posibles variaciones en el número de células transducidas dependiente de cada cultivo individual.

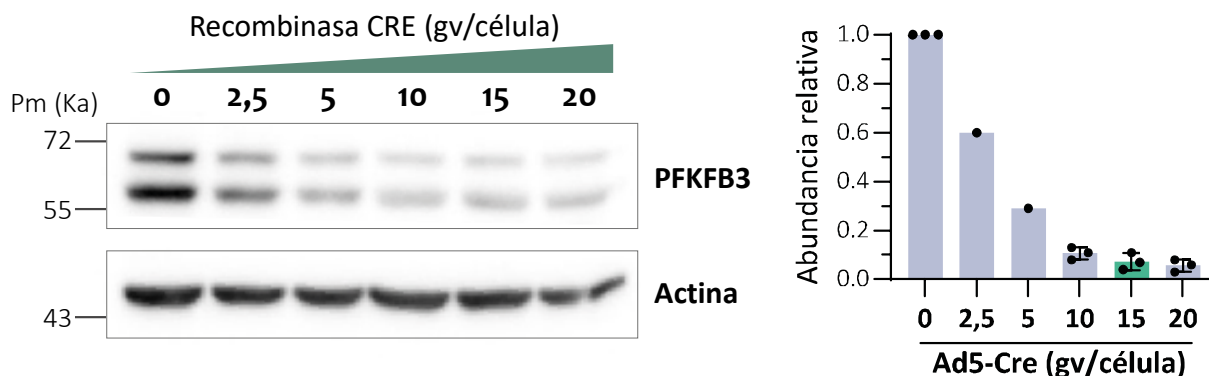


Figura 2. Disminución de los niveles proteicos de PFKFB3 dependiente de la dosis de Ad5-CRE. La disminución de PFKFB3 ya se consigue con la dosis más baja, estabilizándose a partir de 10 genomas virales (vg)/célula. Se muestra una imagen representativa del análisis de la abundancia relativa de PFKFB3 por inmunodetección mediante *Western Blot* de astrocitos *Pfkfb3^{LoxP/LoxP}* transducidos con diferentes dosis de adenovirus 5 que expresaba la CRE recombinasa (Ad5-CRE). La muestra se recogió 6 días después de la transducción. Como control de carga, se utilizó la actina. El histograma de la derecha muestra la cuantificación de la densitometría de las bandas, y los valores se expresan en nº de veces el WT (la dosis de Ad5-Cre = 0). En color verde se indica la dosis seleccionada (15 gv/célula). Media \pm S.E.M (n=1 para las dosis 2,5-5 y n=3 para las dosis 10-20).

Una vez elegida la concentración adecuada de vector viral, se analizó la caída de los niveles proteicos a lo largo del cultivo, posteriormente a la transducción. Se comprobó que la tasa de recambio de la PFKFB3 no es demasiado lenta, ya que la caída de la proteína se evidencia considerablemente 3 días posttransducción, pero no es tan clara a los 2 días (Figura 3).

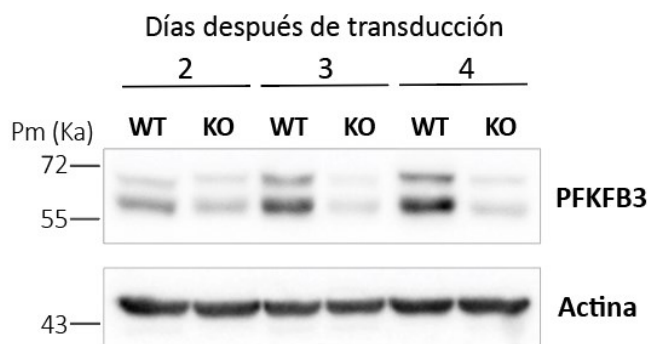


Figura 3. Disminución gradual de los niveles de PFKFB3 tras la transducción viral. A partir del día 3 después de la transducción, se observa una bajada sostenida de los niveles proteicos de PFKFB3. Se muestra una imagen de la abundancia relativa de la proteína por inmunodetección mediante *Western Blot* en cultivo primario de astrocitos transducidos. Se observan muestras recogidas de 2, 3 y 5 días después de la transducción. Como control de carga, se utilizó la actina. (n=1).

De este modo, se comprobó que el modelo KO en cultivo primario de astrocitos representa

una buena aproximación para la eliminación crónica de la proteína proglucolítica PFKFB3.

La eliminación de PFKFB3 en cultivo primario de astrocitos provoca una disminución de los niveles de F26BP intracelulares

Una vez comprobada la disminución crónica de la proteína PFKFB3, se decidió evaluar los niveles de F26BP, principal producto de la reacción catalizada por esta enzima (**Figura 4**).

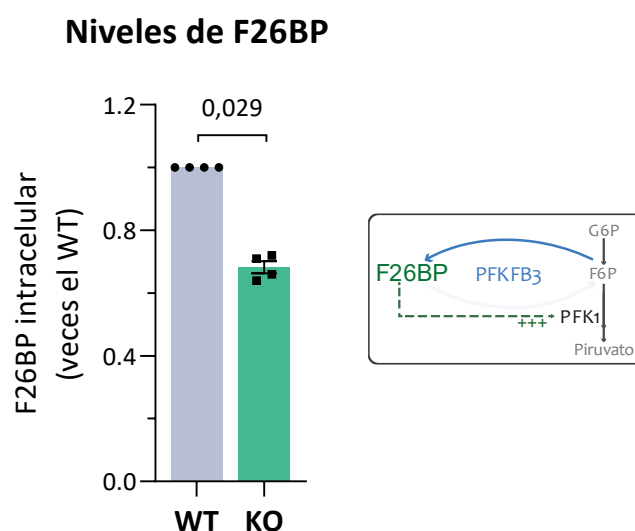


Figura 4. Determinación de los niveles de F26BP intracelulares. El histograma muestra la disminución de los niveles de F26BP intracelulares en los astrocitos PFKFB3 KO en comparación con los WT, medidos indirectamente a través de la actividad de la PFK1. Media \pm S.E.M (n=4); U de Mann-Whitney; *p*-valor \leq 0,1 numérico.

Se observa una bajada en los niveles de F26BP de aproximadamente el 30% en el PFKFB3 KO en comparación con el WT, que es claramente inferior a la observada en los niveles proteicos (**Figura 2**). Es decir, existe una fracción de F26BP que parece no deberse a la actividad de la enzima PFKFB3. No obstante, en el contexto de un regulador alostérico tan fuerte como es el metabolito F26BP, esta disminución podría ser suficiente para conducir a un notable descenso de la actividad de la PFK1 y, consecuentemente, del flujo glucolítico.

La ausencia de PFKFB3 no conlleva al aumento de los niveles proteicos de las otras isoformas de la PFK2

La cantidad remanente de F26BP debe proceder de la acción de otras isoformas de la PFK2, que podrían estar compensando la bajada de PFKFB3. Con objeto de corroborar estas posibles compensaciones, se determinó la abundancia de las diferentes isoformas de la PFK2 (PFKFB1, PFKFB2 y PFKFB4) en cultivo primario de astrocitos (**Figura 5**). Para ello, se utilizó un anticuerpo anti-PFKFB2 y otro dirigido al reconocimiento de las otras dos isoformas a la vez, PFKFB1 y

PFKFB4 (PFKFB1,4). La PFKFB2 se detectó sin problema, lo que es compatible con una buena expresión de la proteína en astrocitos en cultivo. No se detectaron diferencias significativas entre ambos genotipos. Con respecto a las isoformas 1 y 4, la señal conseguida fue mínima, aunque tampoco parece que haya diferencias entre las condiciones WT y KO. Además, aparecen varias bandas cuya especificidad se desconoce, con mayor intensidad fuera del área donde se prevé la banda específica (señalada con una flecha). Paralelamente, se muestra la caída de la PFKFB3 en las mismas condiciones. Al tratarse de anticuerpos diferentes, no se puede establecer una comparación de expresión entre las diferentes isoformas.

Por tanto, no parece que en los astrocitos PFKFB3 KO exista una compensación de las otras isoformas a nivel de abundancia proteica, aunque su presencia podría explicar la falta de reducción total de F26BP. Además, podrían estarse compensando a través de modificaciones postraduccionales activadoras.

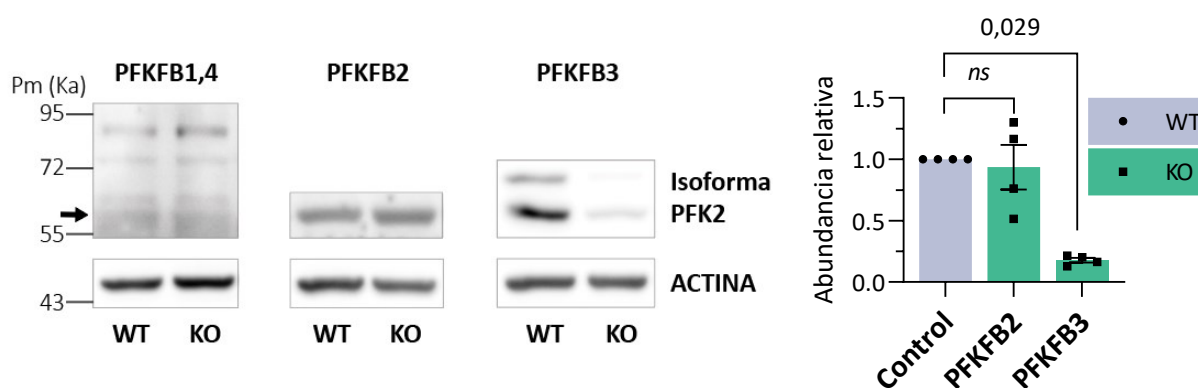


Figura 5. Evaluación de los niveles de las distintas isoformas de la PFK2. Los niveles proteicos de las isoformas PFKFB1,4 y PFKFB2 no parecen alterarse tras la delección génica de la PFKFB3. Se muestra una imagen representativa del estudio de la abundancia relativa de PFKFB1,4, PFKFB2 y PFKFB3 por inmunotransferencia tipo Western Blot de astrocitos WT y PFKFB3 KO (KO). Se utilizó actina como control de carga. El histograma muestra la cuantificación de la densitometría de las bandas de PFKFB2 y PFKFB3, cuyos valores están expresados en nº de veces el WT. Media \pm S.E.M (n=1 PFKFB3/4 y n=3 PFKFB1 y 3); U de Mann-Whitney para cada isoforma (KO vs WT); p-valor \leq 0,1 numérico; ns = no significativo.

La eliminación de PFKFB3 en cultivo primario de astrocitos provoca una disminución del flujo glucolítico

Tras la determinación de los niveles de la F26BP en cultivo primario de astrocitos, se quiso comprobar en qué medida afecta la disminución del principal regulador alostérico de la PFK1 a la velocidad del flujo glucolítico. Para ello, se determinó la capacidad de los astrocitos para metabolizar la glucosa a través de la glucólisis. Se incubaron las células con [3-³H]-glucosa y se determinó la producción de ³H₂O (**Figura 6**). En el mismo experimento, se incluyó cianuro potásico (KCN), un conocido inhibidor del complejo IV mitocondrial, para inducir una depleción

energética que condujese a un aumento de la glucólisis.

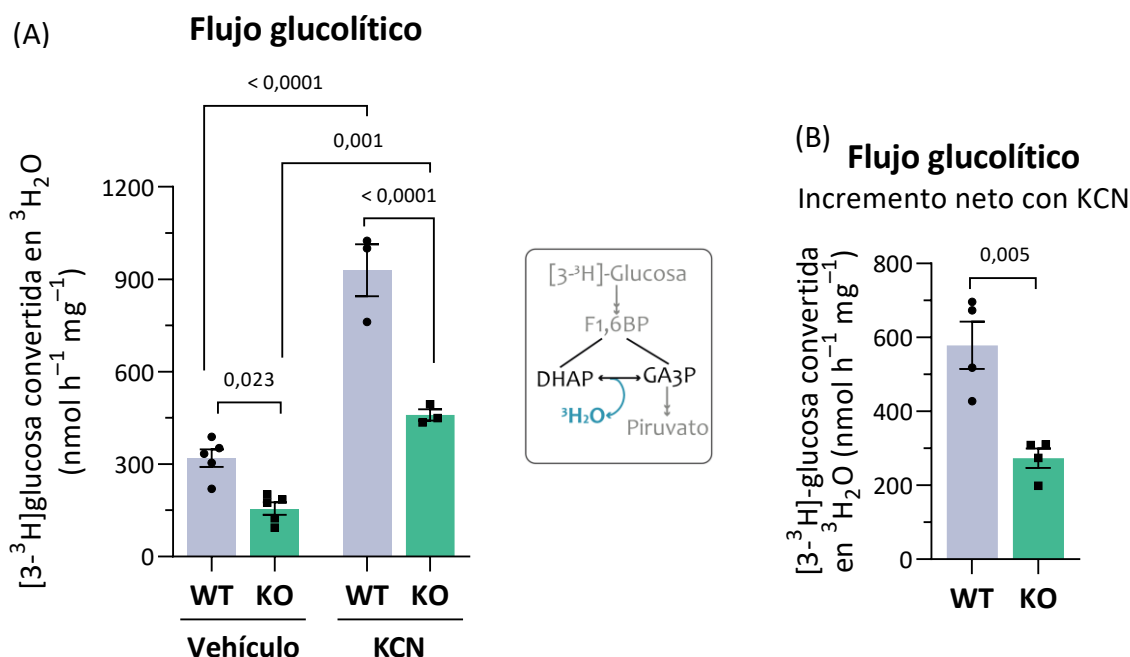


Figura 6. Determinación del flujo glucolítico en cultivos primarios de astrocitos. Se determinaron los niveles de ³H₂O producidos a partir de [3-³H]-glucosa, en condiciones basales (vehículo) y en condiciones estimuladas (KCN) (A). Se observa una bajada significativa del flujo glucolítico en los astrocitos PFKFB3 KO en comparación con los WT, en ambas condiciones. Se muestra que la subida neta del flujo glucolítico, inducida por la adición de KCN, es significativamente menor en los astrocitos PFKFB3 KO en comparación con los WT, calculada como la resta de los valores obtenidos del KCN menos los del vehículo, para cada genotipo (B). Media ± S.E.M (n=4), ANOVA para comparaciones múltiples y *t* de student de dos colas para comparaciones entre dos grupos; *p*-valor ≤ 0,1 numérico.

Se observa una disminución del flujo glucolítico de alrededor de un 50 % tras la eliminación de la PFKFB3, apoyando la validación del modelo. La adición de KCN 1 mM provocó el aumento esperado del flujo glucolítico en ambos genotipos. Sin embargo, cabe destacar que esta subida neta del flujo glucolítico no es equivalente entre ambos grupos, siendo significativamente menor en los astrocitos PFKFB3 KO, lo que resulta en un flujo total considerablemente inferior, en comparación con los astrocitos WT.

[El aumento de la glucólisis por KCN no se debe a un aumento de los niveles de F26BP](#)

El aumento del flujo glucolítico tras la estimulación con KCN en ambos genotipos podría deberse, entre otras causas, a una mayor activación de la PFKFB3 o de otras isoformas de la PFK2. Por ello, se determinaron los niveles de F26BP intracelular tras una incubación de 10 y 30 minutos con KCN (Figura 7).

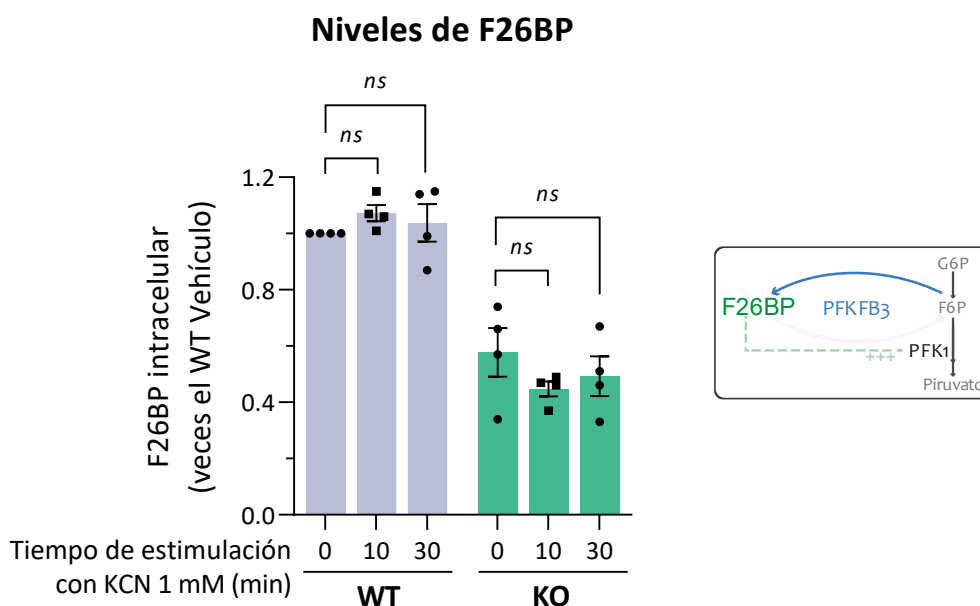


Figura 7. Determinación de los niveles de F26BP intracelulares tras la estimulación con KCN. No se observan cambios en los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato (F26BP) intracelulares entre el tiempo 0 y los tiempos 10 y 30 minutos de estimulación con KCN 1 mM. Se reproduce la bajada de F26BP en los astrocitos PFKFB3 KO (KO). Media \pm S.E.M (n=4); ANOVA para comparaciones múltiples; ns = no significativo.

Se demuestra que el KCN no parece alterar los niveles de F26BP en ninguno de los dos genotipos. Por tanto, el incremento en glucolisis inducido por KCN parece deberse a la activación de otras enzimas, como la propia PFK1, pero no parece actuar sobre la PFK2. Esto contrasta con resultados previos del laboratorio realizados en cultivo de rata (Almeida, Moncada y Bolaños, 2004); es posible que las discrepancias se deban a diferencias de la especie o de las condiciones de cultivo.

II. Evaluación de los cambios metabólicos por la eliminación de PFKFB3 en cultivo primario de astrocitos

Los astrocitos carentes de PFKFB3 no redirigen más glucosa hacia la PPP

Es posible que tras la reducción de la principal vía metabólica de utilización de la glucosa en los astrocitos se produzca un aumento compensatorio de otras vías que en condiciones normales se mantienen más latentes, como es el caso de la PPP. Por ello, se decidió comprobar el flujo metabólico de glucosa a través de esta ruta, para lo cual se incubaron las células con D-[1-¹⁴C]-glucosa y D-[6-¹⁴C]-glucosa, por separado (**Figura 8**). Mientras que la glucosa marcada en el carbono 6 se dirige exclusivamente a través de glucolisis, la marcada en el carbono 1 puede pasar, además, por la PPP, donde este carbono se descarboxila. Una vez convertidas ambas formas isotópicas de la glucosa en piruvato y, posteriormente, en acetil-

CoA, este se descarboxila en el TCA. Así, la determinación del flujo de la PPP se infiere de la diferencia entre la descarboxilación de la glucosa marcada en carbono 1 y la de la marcada en carbono 6, eliminando, de este modo, la contribución de la glucólisis.

No parece que la glucosa se redirija hacia la PPP tras la eliminación de la PFKFB3, ya que no se observan cambios estadísticamente significativos en el flujo de la PPP entre ambos genotipos. La glucosa descarboxilada exclusivamente en el TCA tras oxidarse en la glucólisis, desciende de forma significativa en los astrocitos PFKFB3 KO, un efecto esperable debido la disminución del flujo glucolítico en esta condición. Cabe destacar que la bajada es proporcionalmente menor que la observada en la glucólisis, pero hay que tener en cuenta que esta determinación depende también de otros procesos metabólicos como la entrada del piruvato en la mitocondria, su conversión a acetil-CoA y su entrada al TCA.

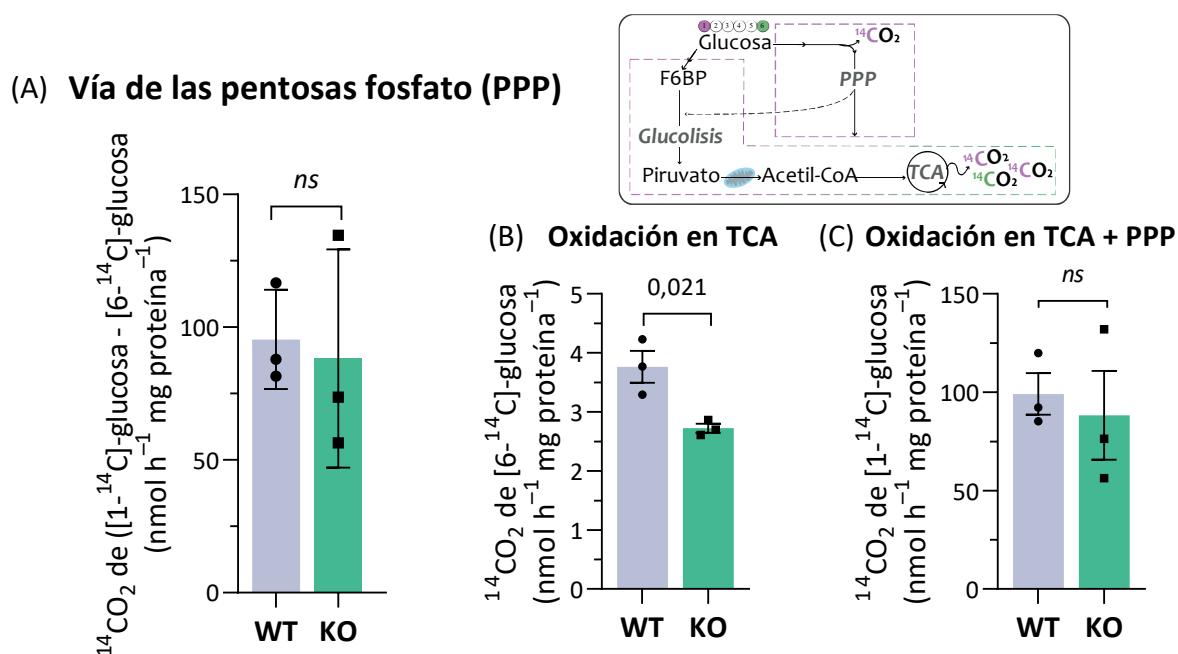


Figura 8. Determinación del flujo de la glucosa a través de la PPP. No se observan cambios en la PPP entre las condiciones WT y PFKFB3 KO (KO). El flujo de la PPP (A) se calcula restando a la descarboxilación de la D-[1-¹⁴C]-glucosa, que se produce tanto a nivel de PPP como en el TCA (B), la de la D-[6-¹⁴C]-glucosa, que es exclusiva del TCA (C). Se observa una reducción significativa en la oxidación de la glucosa a través del TCA. Media ± S.E.M (n=3); t de student de dos colas; p-valor ≤ 0,1 numérico; ns = no significativo.

Los astrocitos PFKFB3 KO presentan alteraciones en el uso del glucógeno

La parte de la glucosa que no se oxida en la glucólisis ni se redirige a la PPP, podría derivarse hacia el glucógeno. Además, durante muchos años de investigación sobre el glucógeno astrocítico se ha observado una estrecha relación con la ruta glucolítica, tanto a nivel

metabólico como funcional. Por este motivo, se decidió comprobar cómo afectaba la disminución de la glucólisis sobre los niveles y la utilización de este importante reservorio energético como es el glucógeno. Para ello, se determinó la concentración de glucógeno intracelular contenida en los astrocitos en condiciones basales, tras la renovación del medio 24 horas antes (**Figura 9A**). Paralelamente, con el objetivo de evaluar el posible uso diferencial del glucógeno en ambos genotipos, a esos mismos cultivos se les retiró la glucosa del medio, para evaluar la presumible pérdida de glucógeno posterior a la depleción de glucosa. Esta aproximación nos sirvió también como control interno experimental.

En condiciones basales, se observa una acumulación de los niveles de glucógeno, aproximadamente del doble, en los astrocitos PFKFB3 KO en comparación con los astrocitos WT, compatible con una mayor derivación de la glucosa hacia la síntesis de glucógeno. Por otra parte, tras la depleción de la glucosa del medio de cultivo, los astrocitos WT comienzan a degradar rápidamente el glucógeno, reduciéndose a la mitad durante los primeros 30 minutos, y alcanzando niveles prácticamente indetectables a las 2 horas. Estos resultados reproducen los observados en otros estudios (Dringen y Hamprecht, 1993). Sin embargo, los astrocitos PFKFB3 KO solo son capaces de degradar una pequeña parte del glucógeno durante los primeros 30 minutos tras la depleción de glucosa, ya que a partir de este tiempo los niveles de glucógeno permanecen inalterados. Estas observaciones nos plantean la posibilidad de que los astrocitos PFKFB3 KO puedan manifestar algún tipo de impedimento para la degradación de glucógeno.

Previamente a la determinación del glucógeno, se determinó la glucosa extracelular tras las 24 horas de renovación del medio de cultivo. Mientras que la concentración de glucosa en los astrocitos WT fue de $3,1 \text{ mM} \pm 0,2$, la de los PFKFB3 KO fue considerablemente mayor, de $4,1 \text{ mM} \pm 0,3$. Estos datos demuestran un menor consumo de glucosa en la condición KO. A pesar de este consumo diferencial de glucosa, en ninguno de los genotipos esta descendió por debajo de la K_m (Constante de Michaelis) de sus transportadores. Sin embargo, para asegurarnos de que este efecto no interfería con la diferencia observada en la cantidad de glucógeno basal, se determinó de nuevo la concentración de glucógeno, pero esta vez tras una incubación de 4 horas en medio fresco con $5,5 \text{ mM}$ de glucosa (**Figura 9B**). Como se puede observar los astrocitos PFKFB3 KO siguen acumulando el glucógeno, en la misma proporción, en comparación con los astrocitos WT.

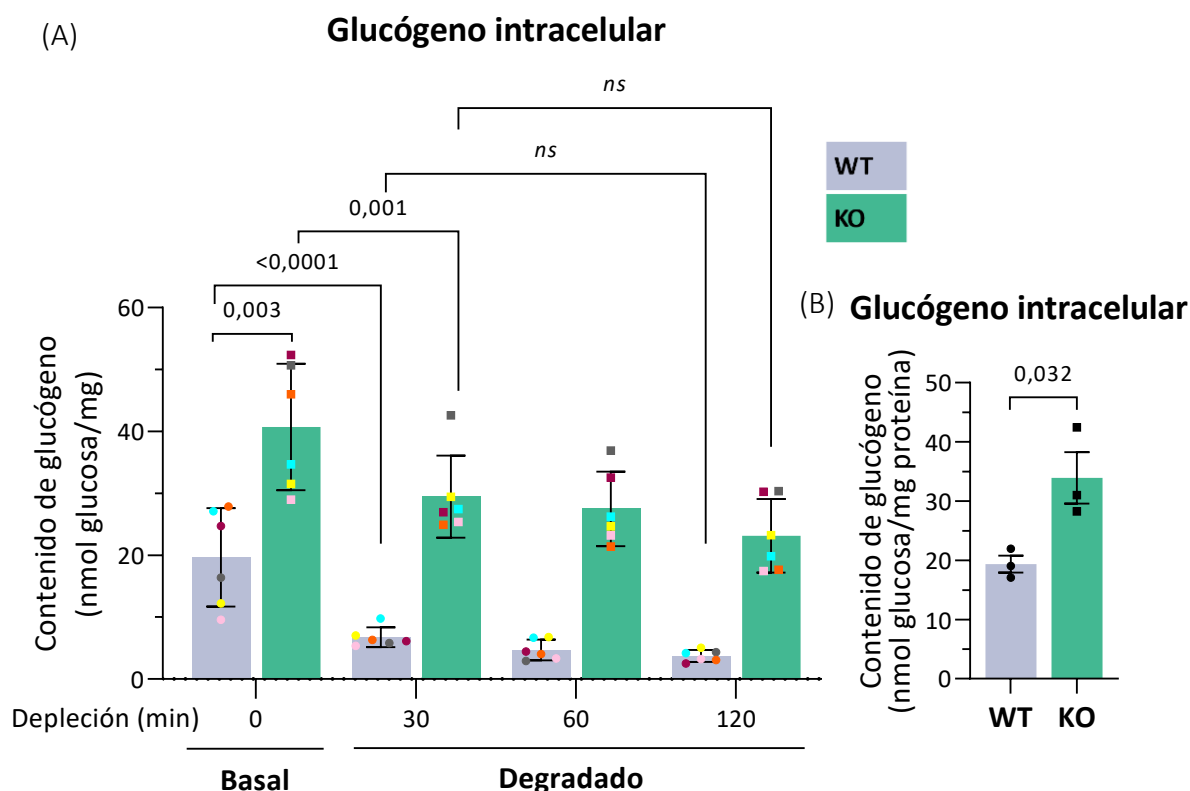


Figura 9. Determinación de los niveles de glucógeno basales y de su degradación tras la depleción de glucosa. Antes de la depleción de glucosa (tiempo cero), lo que se denominó *basal*, se produce una acumulación de glucógeno en los astrocitos PFKFB3 KO (KO). Tras la renovación del medio carente de glucosa, se produce una disminución progresiva de glucógeno en los astrocitos WT hasta los 120 minutos, mientras que en los KO parece que, a partir de los 30 minutos, los niveles se mantienen prácticamente inalterados (A) Se muestran los niveles basales de glucógeno tras una incubación de 4 horas en medio fresco con 5,5 mM de glucosa (B). Media \pm S.E.M (n=6); ANOVA para comparaciones múltiples (A) y *t* de student no pareada de dos colas (B); *p*-valor $\leq 0,1$ numérico; *ns* = no significativo.

Estos resultados apoyan la idea de una posible alteración en el proceso de glucogenolisis en los astrocitos carentes de PFKFB3. Sin embargo, parece que los astrocitos sin PFKFB3 sí son capaces de degradar una pequeña parte del glucógeno, aunque quizás no a la misma velocidad, por lo que su maquinaria de degradación no parece estar totalmente comprometida.

Por ello, se optó por abordar la degradación del glucógeno desde una perspectiva diferente, esto es, provocando un estrés bioenergético mediante el tratamiento con KCN que permite activar el catabolismo celular (**Figura 10**). Se utilizaron dos dosis de KCN, 1 y 4 mM, y se valoraron los niveles de glucógeno tras 15 y 60 minutos de tratamiento. Después del tratamiento de 15 minutos con ambas dosis de KCN, ambos genotipos consumieron prácticamente la totalidad del glucógeno, si bien se observa un remanente mayor en los astrocitos que carecen de PFKFB3. En cambio, a los 60 minutos, las reservas de glucógeno en

ambos genotipos se redujeron hasta niveles mínimos. Por lo tanto, en vista a los resultados, no parece que los astrocitos PFKFB3 KO presenten ninguna alteración intrínseca en el proceso de glucogenólisis ya que son capaces de degradar prácticamente la totalidad de sus reservas frente a una situación de estrés bioenergético.

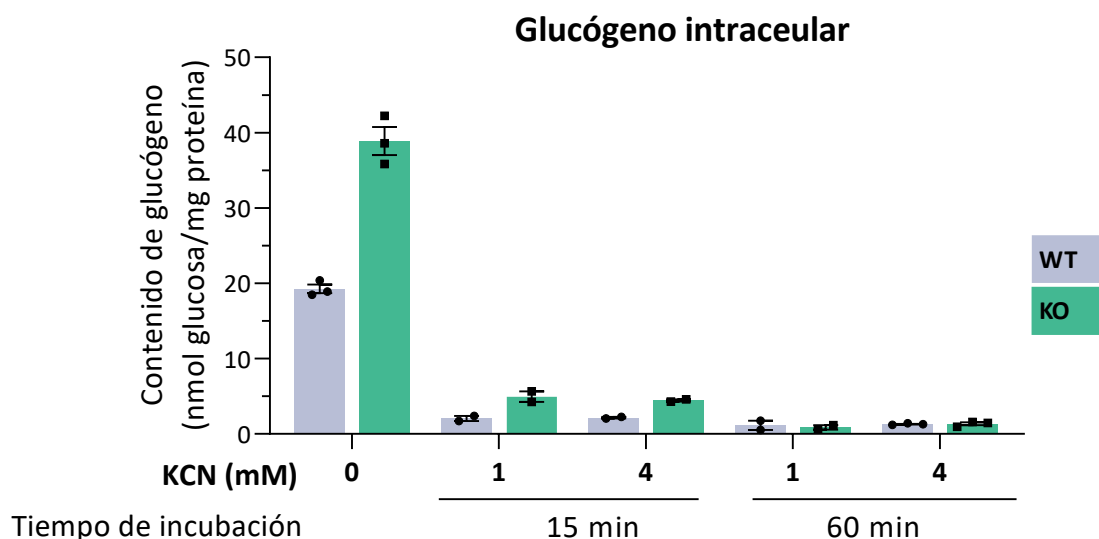


Figura 10. Estimulación de la degradación de glucógeno con KCN. Degradación del glucógeno por estimulación con 1 y 4 mM de KCN durante 15 y 60 minutos. Ambas concentraciones inducen la glucogenólisis en las dos condiciones, WT y PFKFB3 KO (KO). A los 15 minutos, una pequeña proporción del glucógeno de los astrocitos KO se mantiene, reduciéndose al mínimo a los 60 minutos. Media \pm S.E.M (n=2-3).

En la primera aproximación para valorar la degradación del glucógeno, es posible que el metabolismo del astrocito esté altamente afectado por la ausencia total de glucosa, y esto conlleve la activación de otros mecanismos de degradación de glucógeno, como la autofagia (Karabiyik *et al.*, 2021), cuya participación en la degradación del glucógeno ya se ha demostrado, junto con una estrecha interacción entre las proteínas del metabolismo del glucógeno y la red autofágica (Singh y Singh, 2015; Delbridge *et al.*, 2022) Además, en algunos estudios se ha observado una relación de la PFKFB3 con la autofagia (Klarer *et al.*, 2014; Yang, Goronzy y Weyand, 2014). Por ello, se planteó la valoración de esta vía degradativa como posible explicación a ese defecto en la degradación del glucógeno ante la ausencia de glucosa.

Para ello, se empleó cloruro de amonio y leupeptina como inhibidores del proceso de autofagia al nivel de la degradación en el autofagolisosoma. De este modo, se acumularán los productos que estaban siendo normalmente degradados por autofagia con respecto a la condición sin inhibidores, de modo que se podrá así evaluar el flujo autofágico por inmunodetección de algunas proteínas implicadas en el proceso (**Figura 11**). Se utilizaron anticuerpos contra NBR1 y p62, receptores de autofagia que reconocen proteínas dañadas, facilitando su degradación

en autofagosomas y manteniendo la homeostasis celular. Además, se empleó también el anti-LC3-II, una proteína esencial en autofagia, que se asocia a la membrana del autofagosoma, indicando su formación y actividad. Se observa un descenso significativo del flujo a nivel de NBR1 y p62. Con respecto a LC3-II, se aprecia también una bajada del flujo. La otra banda, superior a LC3-II se corresponde con LC3-I, la forma soluble no lipidada; la conversión de LC3-I a LC3-II es un paso crucial en el proceso de formación de los autofagosomas. El descenso en el flujo de LC3-II no es tan marcado como el de p62 y especialmente el de NBR1, por lo que podría existir un impedimento mayor en el proceso de incorporación de cargas específicas para degradar que en la propia degradación por el lisosoma.

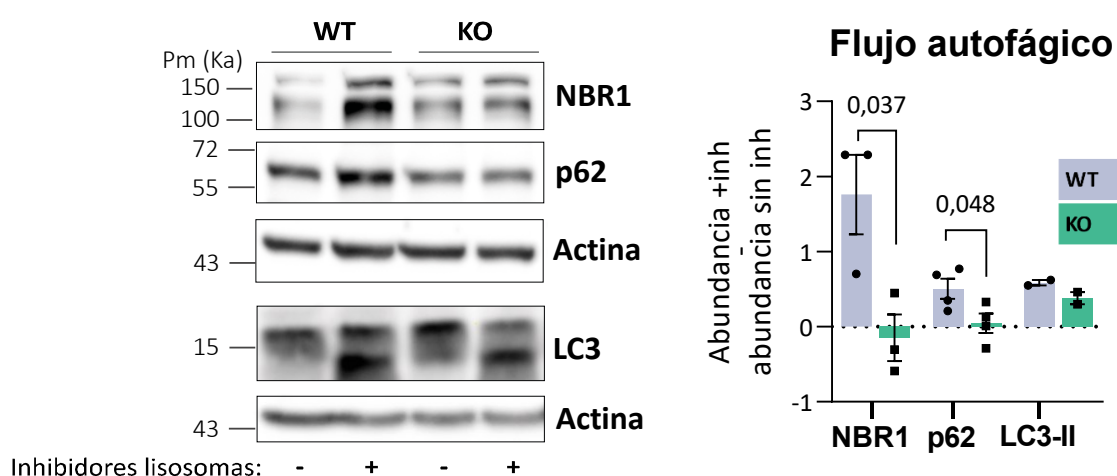


Figura 11. Análisis de la ruta autofágica mediante inhibidores de lisosomas. Se muestra una imagen representativa del estudio de la abundancia relativa de NBR1, p62 y LC3-II (banda inferior) por inmunotransferencia con astrocitos WT y PFKFB3 KO (KO). Se utilizó actina como control de carga. Se observa una reducción del flujo para las tres proteínas, calculado como la resta entre la condición con inhibidores de lisosomas y sin inhibidores, estadísticamente significativa en NBR1 y p62. El histograma muestra el flujo autofágico tras la cuantificación por densitometría de las bandas normalizadas frente a su control de carga. Media \pm S.E.M (n=2-3); *t* de student de dos colas; *p*-valor \leq 0,1 numérico. Inh = inhibidores.

Estos resultados podrían ayudar a explicar el déficit en la degradación de glucógeno ante una depleción de glucosa, aunque habría que estudiar más en detalle esta vía para extraer una conclusión más robusta. Debido a la relevancia de la autofagia, es posible que alteraciones en esta vía tengan alguna implicación metabólica en el acoplamiento astrocito-neurona.

[Las reservas de glucógeno diferenciales en los astrocitos PFKFB3 KO no afectan a su capacidad glucolítica](#)

La "derivación de glucógeno" se refiere al proceso en el cual la glucosa se utiliza para sintetizar y almacenar glucógeno en lugar de metabolizarse directamente a través de la glucólisis para producir energía. Un desajuste en este proceso podría afectar directamente a la velocidad del

flujo glucolítico, por lo que se quiso comprobar si las diferencias encontradas en los niveles de glucógeno por la ausencia de PFKFB3 eran capaces de afectar directamente a la ruta glucolítica. Para ello, se repitió la medida de flujo glucolítico pero utilizando 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB) que es un potente inhibidor de la glucógeno fosforilasa y, por tanto, de la glucogenólisis (Dringen, Gebhardt y Hamprecht, 1993; Walls *et al.*, 2008). En primer lugar, se evaluó la eficiencia del compuesto previniendo la degradación de glucógeno ante una depleción de glucosa (**Figura 12A**). Se realizó una incubación previa de 2 horas con dos concentraciones de DAB, 300 μM y 1 mM que se mantuvieron durante todo el proceso experimental. Paralelamente, se llevaron controles con DAB cuyo glucógeno se analizó previamente a la depleción de glucosa, puesto que se sabe que este inhibidor puede afectar levemente a la glucógeno sintasa, responsable de la síntesis del glucógeno (Walls *et al.*, 2008).

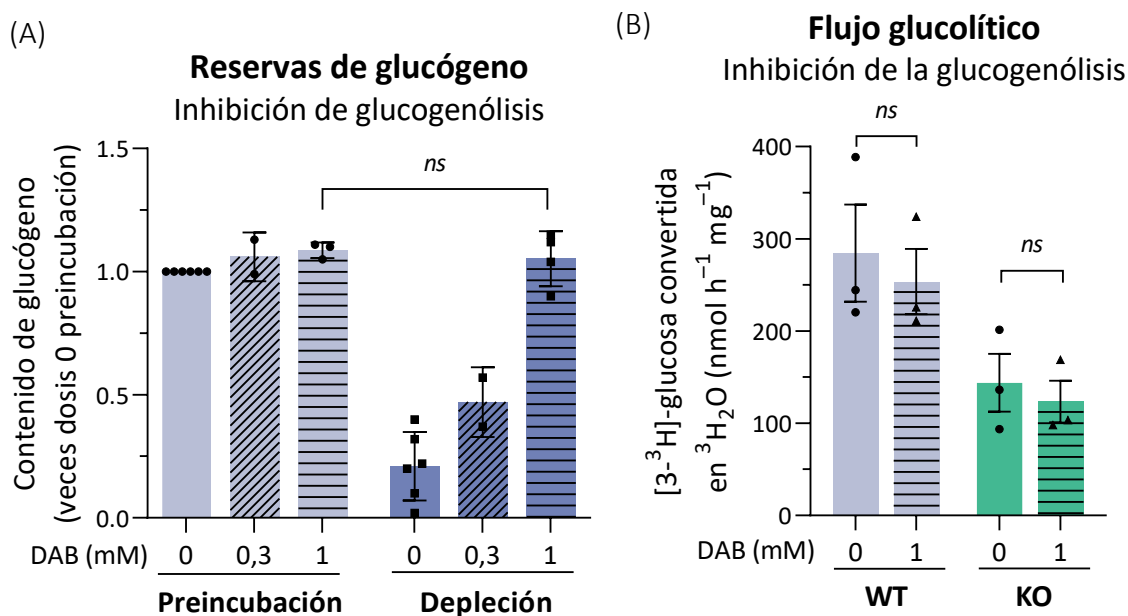


Figura 12. Determinación del efecto del inhibidor DAB sobre la degradación de glucógeno y la glucólisis. La degradación del glucógeno determinada tras 1 hora de depleción de glucosa se previene con el inhibidor DAB a una dosis de 1 mM, pero no a la dosis de 0,3 mM (A). Utilizando las mismas condiciones, se evalúa el flujo glucolítico tras incubación con [3-³H]-glucosa y analizar la producción de ³H₂O. El inhibidor no ocasiona ninguna alteración significativa en el flujo glucolítico en ninguno de los genotipos (B). Media \pm S.E.M (n=2-4 para glucógeno y n=3 para el flujo glucolítico); ANOVA; ns = no significativo.

Una vez evaluada la eficiente capacidad del DAB para inhibir la degradación del glucógeno, se verificó si la capacidad glucolítica de ambos tipos de astrocitos estaba influenciada o determinada por los diferentes niveles de glucógeno. Como se observa en la **Figura 12B**, la completa inhibición de la glucogenólisis, utilizando la dosis de 1 mM de DAB, no altera significativamente el flujo glucolítico en ninguno de los dos genotipos, WT y PFKFB3 KO.

Estos resultados nos permiten concluir que las distintas reservas de glucógeno entre ambos genotipos no determinan su capacidad glucolítica.

La capacidad de captación de la glucosa se reduce por la ausencia de PFKFB3 en astrocitos

La mayor acumulación de glucógeno en los astrocitos que carecen de PFKFB3 podría deberse simplemente al menor consumo general de la glucosa. Este efecto se evidenció al observar una mayor concentración de glucosa en estos astrocitos tras 24 horas de incubación [ver apartado 8]. Sin embargo, se quiso comprobar si existía una alteración en el propio proceso de captación de la glucosa, quizás por una regulación más exhaustiva de sus transportadores. Para ello, se incubaron las células con desoxi-D-glucosa, 2-[1,2- ^3H (N)] (^3H]-2DG) durante 20 minutos, y se evaluó la incorporación de este metabolito al interior celular (**Figura 13**).

Captación de glucosa

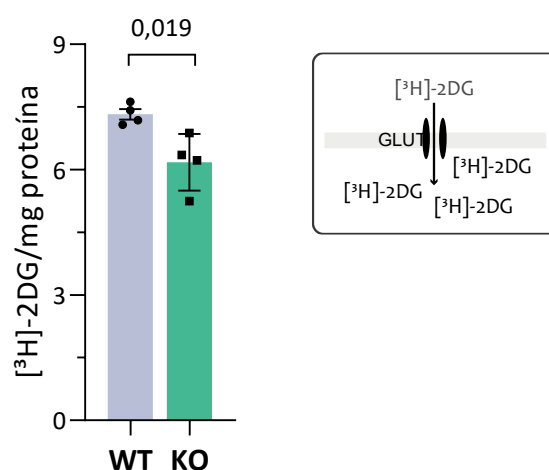


Figura 13. Captación de glucosa mediante incubación con [^3H]-2-deoxiglucosa. Los astrocitos PFKFB3 KO (KO) muestran una disminución de la captación de glucosa a tiempos cortos (10 minutos). Los niveles intracelulares de [^3H]-2DG se determinaron radiactivamente tras la incubación con [^3H]-2DG durante 120 minutos. Media \pm S.E.M (n=4); t de student de dos colas; p-valor \leq 0,1 numérico.

Los astrocitos PFKFB3 KO muestran una menor captación de [^3H]-2DG extrapolable a la captación de glucosa, lo que plantea la posibilidad de que estos presenten una disminución en el número de transportadores GLUT de membrana. Se trata de una bajada estadísticamente significativa pero modesta, que no explica la pronunciada reducción observada en la velocidad del flujo glucolítico en estas células carentes de PFKFB3. En cambio, sí podría estar relacionada con la tendencia a la baja en la PPP.

La delección de PFKFB3 en los astrocitos conduce a una disminución de la producción de lactato extracelular

Un menor flujo de glucolisis va a conducir a una menor producción de piruvato, un metabolito que en astrocitos se deriva principalmente hacia la producción de lactato frente a la entrada a la mitocondria para formar acetil-CoA. Por lo tanto, es esperable una reducción de la producción de lactato en ausencia de la PFKFB3. Para corroborar esto, se determinaron los niveles de lactato extracelular tras 3 horas de incubación en medio fresco (**Figura 14**).

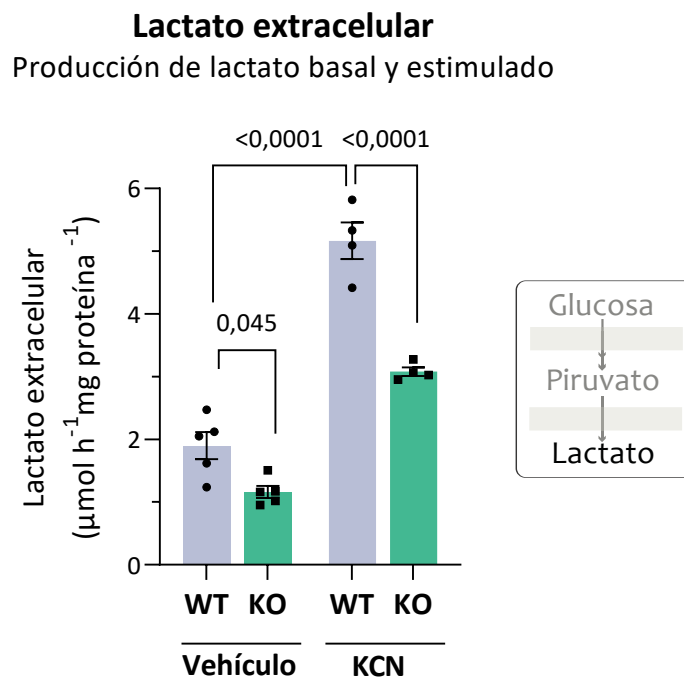


Figura 14. Determinación de la producción de lactato extracelular. La eliminación de PFKFB3 en los astrocitos produce una disminución significativa en la producción de lactato extracelular, que es aún más evidente tras la estimulación glucolítica con cianuro potásico (KCN) 1 mM. Media \pm S.E.M (n=4-5); ANOVA para comparaciones múltiples; *p*-valor \leq 0,1 numérico.

Se observa una reducción significativa del lactato extracelular producido por los astrocitos PFKFB3 KO, de aproximadamente un 35 % con respecto al producido por los WT. Por otra parte, el tratamiento con KCN provoca un sustancial incremento en ambos genotipos. Estos resultados son totalmente compatibles con los observados en el flujo glucolítico (**Figura 5**). La disminución de lactato podrá tener consecuencias en el acoplamiento astrocito-neurona.

La eliminación de PFKFB3 en los astrocitos provoca un aumento de la entrada de piruvato en la mitocondria

El otro destino principal del piruvato generado en la glucolisis es su entrada en la mitocondria a través de su conversión a acetil-CoA por la PDH. Por lo tanto, no es sorprendente que se

produzcan alteraciones, en este sentido, en los astrocitos PFKFB3 KO que tienen mermada su capacidad glucolítica. Se decidió evaluar la actividad de esta enzima mediante el empleo de [1-¹⁴C]-piruvato. La descarboxilación del carbono 1 marcado se produce a nivel de esta reacción (**Figura 15**).

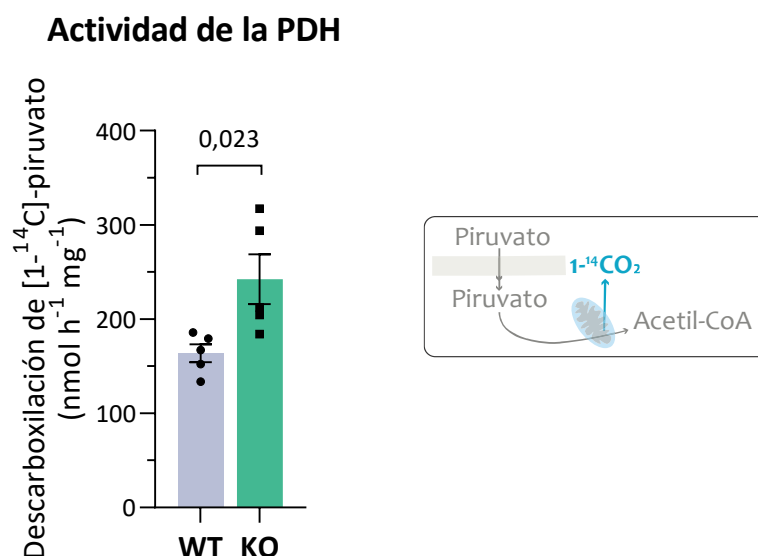


Figura 15. Descarboxilación del piruvato por la PDH. La eliminación de PFKFB3 en los astrocitos produce un incremento significativo en la actividad de la PDH, que convierte el piruvato en acetil-CoA en la mitocondria produciendo CO₂. Media ± S.E.M (n=5); t de student de dos colas; p-valor ≤ 0,1 numérico.

En lugar de una disminución de la entrada del piruvato a la mitocondria, como cabría esperar por su reducida velocidad glucolítica, se observó un incremento significativo de su descarboxilación oxidativa mitocondrial en los astrocitos PFKFB3 KO, indicando una remodelación metabólica en estas células.

La actividad de la PDH está muy regulada por fosforilación. De hecho, los astrocitos, en comparación con las neuronas, presentan mayores niveles de fosforilación de la PDH, manteniéndola menos activa y favoreciendo la conversión del piruvato hacia lactato. Por tanto, es posible que el aumento en la actividad de esta enzima mitocondrial esté causado por una disminución de la inhibición mediante mecanismos de fosforilación. Para comprobarlo, se realizó la inmunodetección por *Western Blot* de la proteína total y fosforilada, y se determinó el ratio entre ambas (**Figura 16**).

No se observan diferencias significativas en la fosforilación de la PDH entre ambos genotipos, por lo que la regulación podría encontrarse a otro nivel.

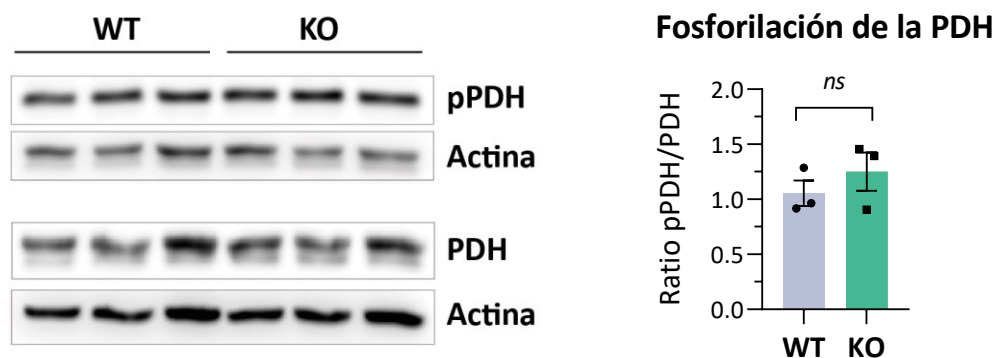


Figura 16. Determinación de los niveles de fosforilación de la PDH. Los niveles de fosforilación de la PDH no parecen alterarse tras la delección genética de la PFKFB3. Se muestra la imagen de la abundancia relativa de la PDH total y la fosfo-PDH (pPDH) por inmunotransferencia de astrocytos WT y KO. Se utilizó la actina como control de carga. El histograma muestra los valores de la cuantificación densitométrica, expresados en ratio pPDH/PDH total, tras ser normalizados con su respectivo control de carga. Media \pm S.E.M (n=3); *t* de student de dos colas; ns = no significativo.

A continuación, se decidió comprobar si el incremento en la entrada del piruvato conducía también a un aumento en la entrada del acetil-CoA en el TCA, para indagar en las posibles consecuencias de esta reconfiguración metabólica. Para ello, se incubaron los astrocytos con [2-¹⁴C]-piruvato, cuyo carbono marcado escapa de la acción de la PDH, por lo que el CO₂ detectado proviene esencialmente del TCA (**Figura 17**). Se evidencia en los astrocytos que no tienen PFKFB3 (KO), un aumento significativo de la descarboxilación del piruvato en el TCA, independiente de la acción de la PDH, indicando que hay una mayor velocidad de entrada del piruvato en el TCA en estos astrocytos, en comparación con los WT.

Descarboxilación del piruvato en el TCA

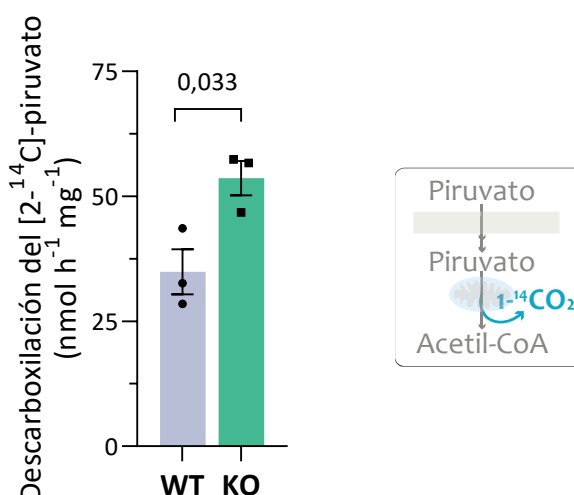


Figura 17. Descarboxilación del piruvato en el TCA. La eliminación de PFKFB3 en astrocytos (KO) produce un incremento de la entrada del piruvato en el TCA, donde se descarboxila. Media \pm S.E.M (n=3); *t* de student de dos colas; *p*-valor \leq 0,1 numérico.

Estos resultados apoyan la idea de que existe un remodelado metabólico a nivel mitocondrial

en estos astrocitos carentes de PFKFB3, ya que a pesar de tener reducida su capacidad glucolítica, son capaces de incrementar significativamente la entrada de piruvato en el TCA en forma de acetil-CoA. Este incremento de acetil-CoA puede dirigirse además a otros destinos metabólicos como la formación de cuerpos cetónicos.

Los astrocitos carentes de PFKFB3 no compensan su escasa capacidad glucolítica con una mayor tasa de oxidación de ácidos grasos

Otra fuente importante de acetil-CoA en los astrocitos, además del piruvato, son los ácidos grasos a través de la β -oxidación. Recientemente se ha publicado un estudio en el que, ante un detrimento en la ruta glucolítica de la glía de *Drosophila*, la oxidación de los ácidos grasos se vuelve indispensable para la supervivencia (McMullen *et al.*, 2023). Es posible, por tanto, que los astrocitos sin PFKFB3 sean capaces de aumentar este proceso catabólico, contribuyendo aún más a la entrada de acetil-CoA en la mitocondria, y manteniendo las demandas del TCA. Para comprobarlo, se determinó la velocidad del flujo de β -oxidación en cultivos primarios de astrocitos, para lo cual se incubaron con el ácido graso [9,10- 3 H]-palmitato, que produce 3 H₂O en las reacciones catalizadas por las acil-CoA deshidrogenasas (**Figura 18**). Como control del experimento se incluyó un tratamiento con etomoxir que es un inhibidor de la Carnitina Palmitoiltransferasa 1 (CPT1), esencial para la internalización de ácidos grasos en la mitocondria.

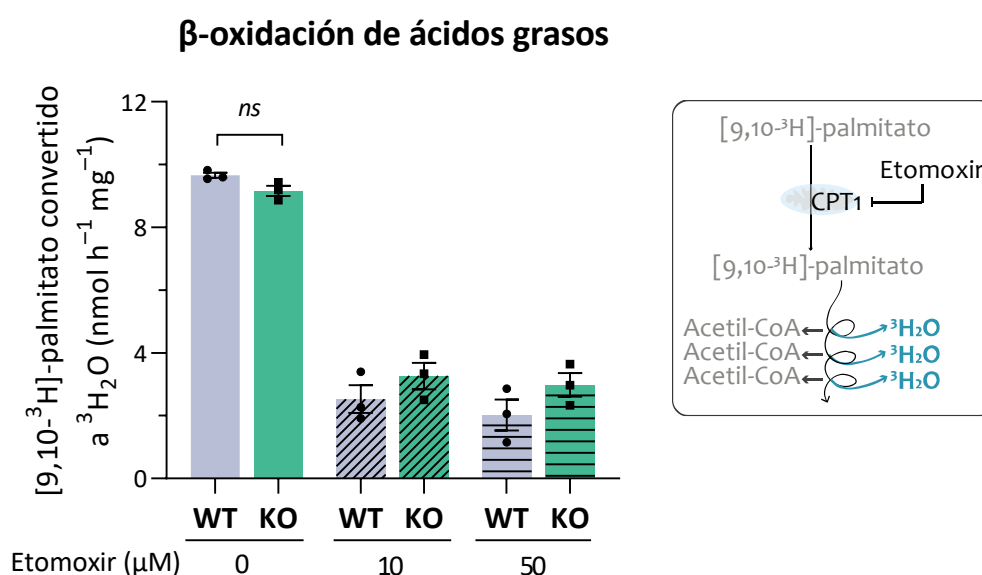


Figura 18. β -oxidación de ácidos grasos basal e inhibida por etomoxir. La eliminación de PFKFB3 en astrocitos (KO) no altera la velocidad del flujo de β -oxidación de [9,10- 3 H]-palmitato, medida a partir de la producción de 3 H₂O. El tratamiento con etomoxir, tanto con la dosis de 10 μ M como con la de 50 μ M, reduce considerablemente la β -oxidación, lo que sirve como validación del método. Media \pm S.E.M (n=3); t de student de dos colas para la comparativa WT-KO; ns = no significativo.

Como se observa en la **Figura 18**, los astrocitos que carecen de PFKFB3 presentan la misma tasa de β -oxidación de ácidos grasos que los astrocitos WT. Por tanto, a la vista de estos resultados, se puede confirmar que la reducida tasa glucolítica provocada por la delección genética de PFKFB3 en los astrocitos KO, no es capaz de inducir cambios en la velocidad de β -oxidación como mecanismo compensatorio.

La descarboxilación mitocondrial del acetil-CoA producido a partir de ácidos grasos es mayor en los astrocitos carentes de PFKFB3

A pesar de haber confirmado que no se produce un incremento en la β -oxidación en los astrocitos PFKFB3 KO, se quiso examinar si el acetil-CoA resultante es diferencialmente metabolizado en comparación con los astrocitos WT, a la luz de las observaciones previas que indicaban una mayor descarboxilación de piruvato. Para ello, se incubaron las células con [1- 14 C]-palmitato que, a través de la β -oxidación, se va a convertir en [1- 14 C]-acetil-CoA, que puede introducirse en el TCA, descarboxilándose en la primera vuelta del ciclo (**Figura 19A**). Dado que el acetil-CoA puede destinarse también a la formación de cuerpos cetónicos, con esta aproximación se pudo analizar también el proceso de cetogénesis, extrayendo los cuerpos cetónicos como producto no volátil y soluble en ácido (**Figura 19B**).

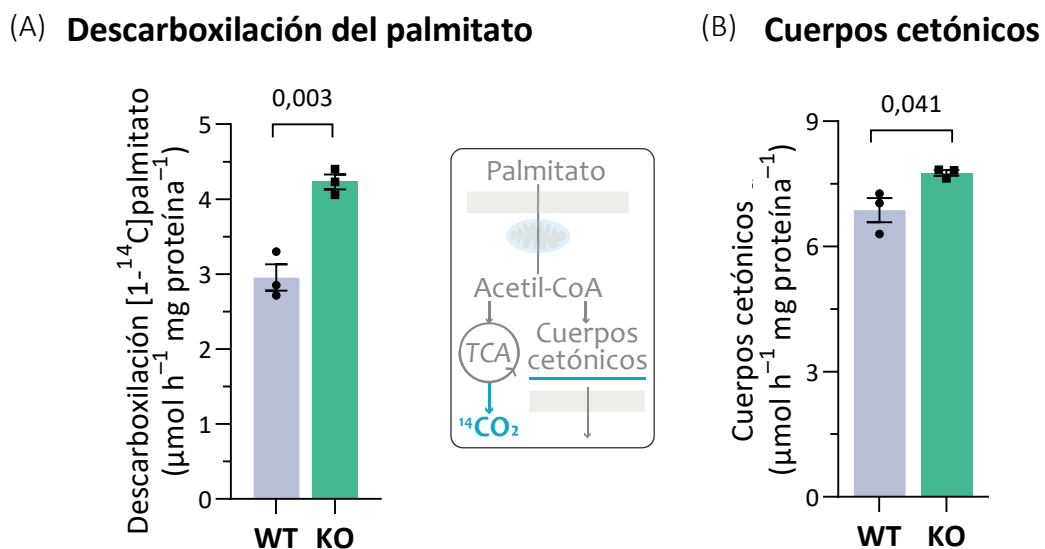


Figura 19. Derivación del acetil-CoA procedente del palmitato hacia el TCA y cuerpos cetónicos. Se produce un aumento de la descarboxilación del palmitato en el TCA en la condición PFKFB3 KO (KO) con respecto al WT (A). Se observa también un leve y significativo aumento de la derivación del acetil-CoA hacia la formación de cuerpos cetónicos (B). Media \pm S.E.M (n=3); t de student de dos colas; p-valor \leq 0,1 numérico.

En primer lugar, se observa un incremento significativo de la entrada de palmitato al TCA en ausencia de PFKFB3. La descarboxilación del palmitato determinada depende tanto del

proceso propio de β -oxidación como de la entrada en el TCA del acetyl-CoA producido. Teniendo en cuenta que la β -oxidación no se encuentra alterada, el aumento de la entrada de palmitato en el TCA no está limitado por este proceso. Concomitantemente, se está produciendo un leve pero significativo aumento de la producción de cuerpos cetónicos a partir de palmitato. Estos resultados apoyan la idea de que la eliminación de PFKFB3 en los astrocitos, induce una remodelación metabólica a nivel mitocondrial, hiperactivándose la maquinaria asociada con el TCA y con otros procesos metabólicos como la cetogénesis.

La activación del TCA no se debe a un disminución del NADH

Una disminución de la glucólisis puede provocar el descenso de los niveles de NADH. El ciclo de TCA puede regularse mediante la proporción de NAD/NADH, ya que el NAD es el sustrato de varias enzimas de este ciclo y altas concentraciones de NADH lo inhiben. Mediante un ensayo fluorimétrico, se determinaron los niveles totales de NAD y NADH y se analizó el cociente entre ambos (**Figura 20**).

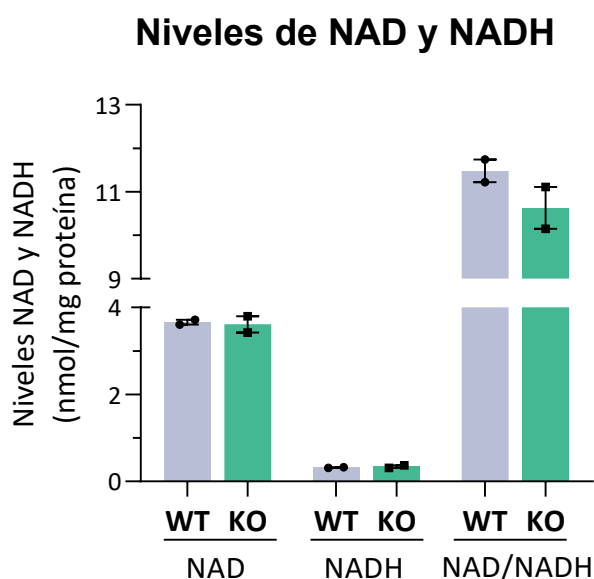


Figura 20. Niveles totales de NAD y NADH en cultivo de astrocitos PFKFB3 KO. Se muestran los valores totales de NAD y NADH, así como la ratio NAD/NADH de extractos de astrocitos WT y PFKFB3 KO (KO). No se aprecian diferencias en los niveles de NAD ni NADH, y se observa una reducida tendencia a la bajada en el ratio. Media \pm S.E.M (n=2).

No se observaron grandes cambios en la concentración de NAD y NADH. Además, no hay un aumento de la ratio NAD/NADH, lo que sugiere que no se produce un descenso de NADH causante de esa hiperactivación del TCA, sino una posible tendencia a la baja. Por lo tanto, es concebible que un posible incremento en la velocidad de regeneración de NADH por la mayor actividad del ciclo se esté compensando con un aumento en su utilización, por ejemplo, a

través del complejo I de la CTE. No obstante, hay que tener en cuenta que el análisis se realiza de los niveles totales, y es posible que exista una ratio diferencial NAD/NADH en la mitocondria con respecto al citosol, que en esta aproximación no se puede discernir.

La remodelación mitocondrial en ausencia de PFKFB3 conduce a un aumento de la respiración mitocondrial.

Como se mencionó anteriormente, es concebible que un TCA más activo puede afectar a la actividad del complejo I de la CTE y, por ende, a la fosforilación oxidativa. Para evaluar el funcionamiento de la cadena se empleó la tecnología Seahorse XF24, que permite medir el OCR (**Figura 21**). Empleando el protocolo de *MitoStress*, que se basa en el uso de varios inhibidores de los componentes de la CTE, se pueden valorar distintos parámetros asociados a la OCR. Se valoró tanto la respiración mitocondrial basal como la capacidad máxima de respiración de las células, lo que permite comprobar su capacidad para responder a estímulos, fisiológicos o no, y evaluar su rango de adaptación. Para ello se emplea FCCP, que desacopla la CTE de la fosforilación oxidativa, permitiendo una respiración más rápida y máxima. Este protocolo también utiliza oligomicina como inhibidor de la ATPasa (Complejo V), y rotenona y antimicina como inhibidores de los complejos I y III, respectivamente. De las medidas puntuales de OCR [ver *Materiales y Métodos*, apartado 14], se extrapolaron algunos parámetros que describen las características de la CTE.

En la gráfica temporal de OCR, se aprecia un aumento del consumo inicial de oxígeno, que se hace muy evidente tras la adición de FCCP (**Figura 21A**). Para realizar una comparativa adecuada entre ambos genotipos, debemos fijarnos en los histogramas que reflejan los diferentes parámetros extrapolables del gráfico (**Figura 21B**). Se observa un aumento significativo de la OCR asociado a la respiración no mitocondrial, máxima y de reserva, en los astrocitos que carecen de PFKFB3 en comparación con los WT. Con respecto a la respiración basal, existe una tendencia al aumento en los KO, aunque moderado. En primer lugar, se puede concluir que la ausencia de PFKFB3 parece conducir al incremento del OCR no asociado a mitocondria, lo que puede estar relacionado con la actividad de enzimas como las NADPH oxidasas o con ciertos procesos de detoxificación de ROS. En segundo lugar, un aumento en la respiración basal, que debe ser confirmado, junto con el incremento de la respiración máxima y de reserva en estos astrocitos PFKFB3 KO, se podría relacionar con una alteración de la conformación estructural de los complejos mitocondriales. Además, un aumento de

respiración en condiciones de estimulación máxima podría estar confiriendo una ventaja adaptativa frente a determinados estímulos como el estrés bioenergético.

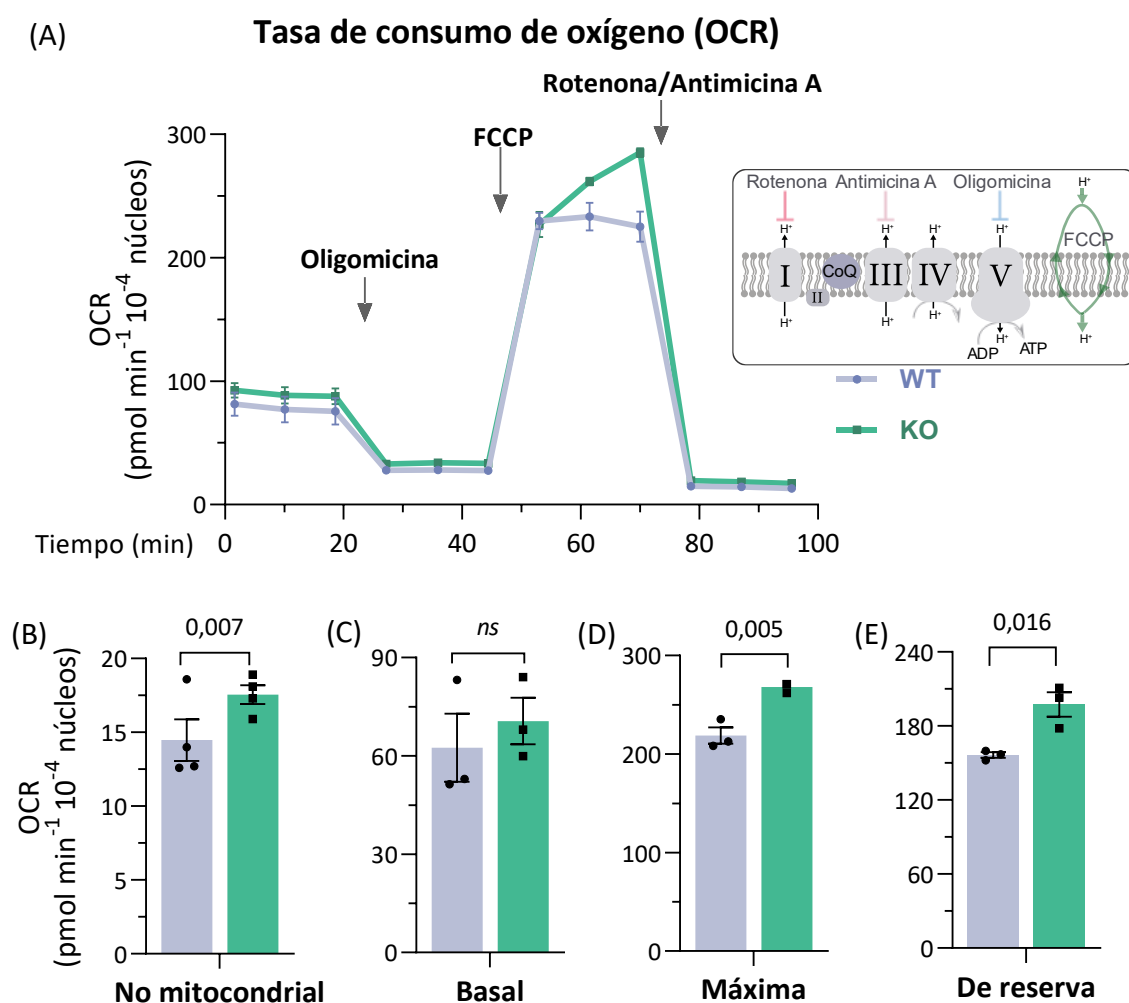


Figura 21. Tasa de consumo de oxígeno durante el ensayo MitoStress. Perfil clásico del ensayo de MitoStress: la oligomicina inhibe la ATPasa, causando un descenso del consumo de oxígeno (OCR) al bloquear la fosforilación oxidativa; el FCCP desacopla, permitiendo el máximo funcionamiento de la cadena de transporte; la rotenona y la antimicina A inhiben los complejos I y III, respectivamente, anulando completamente la respiración mitocondrial (A). Las últimas determinaciones se corresponden con la medida de la respiración no mitocondrial. Se muestran los histogramas que reflejan algunos parámetros extrapolados de la gráfica superior (B-E). Se observan diferencias significativas en OCR no mitocondrial, máxima y de reserva entre los astrocitos sin PFKFB3 (KO) y los WT. Media \pm S.E.M (n=3); t de student de dos colas; p-valor \leq 0,1 numérico.

La remodelación metabólica mitocondrial inducida por la ausencia de PFKFB3 en los astrocitos afecta a la función energética de la CTE y a la fosforilación oxidativa

En células como los astrocitos, donde la glucólisis es predominante, la falta de PFKFB3 podría reducir la producción total de ATP si no se compensa con otras fuentes de obtención de energía. A la luz de los resultados obtenidos en el experimento anterior, se planteó determinar si el aumento de la respiración estaba acompañado de una mayor eficiencia en la función

energética de la CTE y la fosforilación oxidativa. Para ello, aprovechando de nuevo la tecnología Seahorse se lleva a cabo la determinación de la tasa de producción de ATP (*ATP rate*) (**Figura 22A**). Este protocolo permite de nuevo evaluar la respiración basal y confirmar la tendencia observada en el experimento anterior. Además del OCR, este protocolo emplea también el ECAR. La combinación de estos parámetros con otros factores de valor conocido permite estimar la producción de ATP glucolítico (glucoATP) y ATP mitocondrial (mitoATP). Por otro lado, se determinaron los niveles totales de ATP intracelular, mediante un ensayo de bioluminiscencia (**Figura 22B**).

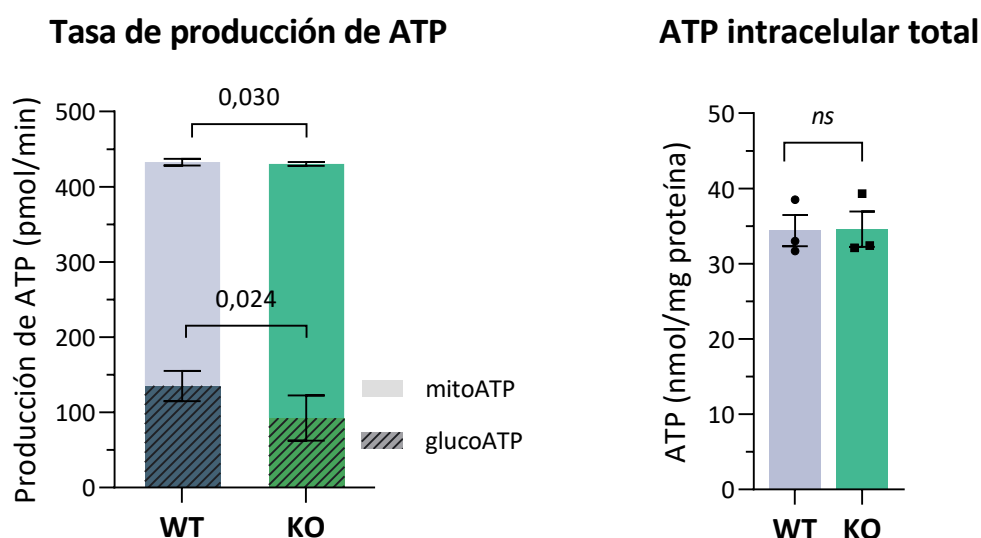


Figura 22. Tasa de producción de ATP glucolítico y mitocondrial y niveles totales de ATP intracelular. La tasa de producción de ATP o *ATP rate* permite estimar la producción de ATP producido en la mitocondria (mitoATP) y en la glucólisis (glucoATP), de forma independiente (**A**). Se observa una disminución del glucoATP, que concurre con un aumento del mitoATP de igual dimensión en los astrocitos PFKFB3 KO (KO) en comparación con los astrocitos WT. Los niveles totales de ATP intracelular, determinados mediante un ensayo bioluminiscente (**B**), permanecen invariables en ambas condiciones WT y PFKFB3 KO (KO). Media \pm S.E.M (n=3); *t* de student de dos colas; *p*-valor $\leq 0,1$ numérico; *ns* = no significativo.

Se puede observar una disminución de la producción de ATP glucolítico, compatible con la reducción de la glucólisis en los astrocitos PFKFB3 KO en comparación con los WT. En cambio, este descenso viene acompañado de una subida en los niveles de ATP mitocondrial en proporción similar. De este modo, la suma de ambos no difiere entre la condición WT y la PFKFB3 KO. Por tanto, el ATP producido por fosforilación oxidativa estaría compensando el defecto en la producción de ATP por la glucólisis. Por otra parte, los niveles totales de ATP intracelular permanecen invariables entre las condiciones WT y PFKFB3 KO. Estos resultados son compatibles con la existencia de una compensación energética mitocondrial como consecuencia de una depleción energética citosólica en los astrocitos KO. Por lo tanto, a pesar de la reducción del 50 % en la vía glucolítica de los astrocitos que carecen de PFKFB3 no se

observa un fenotipo de déficit energético en ellos, ya que están compensando con una mayor producción de ATP mitocondrial debida a la remodelación metabólica que experimentan.

La eliminación de la PFKFB3 en astrocitos conduce a una reestructuración de la cadena de transporte mitocondrial

Como se ha demostrado en investigaciones de nuestro laboratorio y de otros grupos, la estructuración de los complejos mitocondriales en la CTE juega un papel crucial en la eficiencia energética mitocondrial, además de en la generación de ROS. Por ello, se analizó el grado de ensamblaje de los complejos mitocondriales, mediante electroforesis en condiciones nativas. Para ello, se estudiaron las proteínas NDUFA9, perteneciente al módulo Q del complejo I, y UQCR2, una proteína esencial del complejo III, a partir de muestras procedentes de mitocondrias extraídas de cultivos de astrocitos (**Figura 23**).

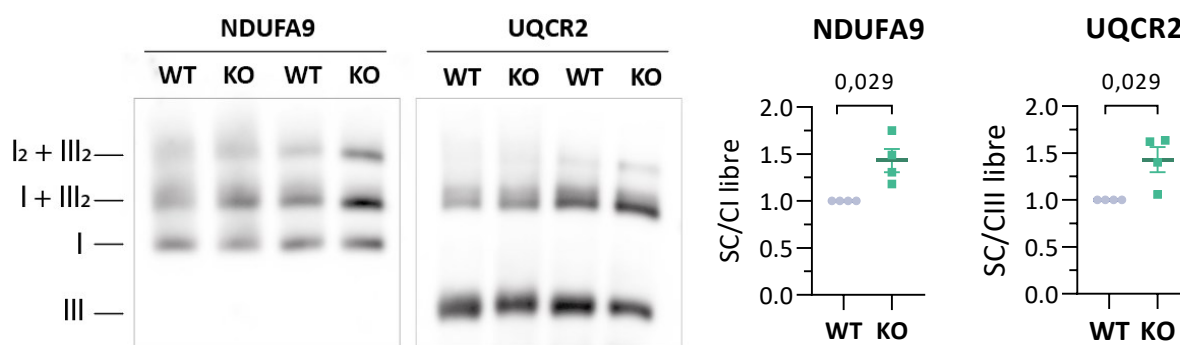


Figura 23. Ensamblaje de los complejos I-III mitocondriales. Imágenes representativas de dos electroforesis en condiciones nativas de las proteínas mitocondriales NDUFA9 (CI) y UQCRC2 (CIII), donde se aprecia un mayor grado de ensamblaje de los complejos I y III en supercomplejos en los astrocitos que carecen de PFKFB3 (KO). Los histogramas incluyen las respectivas cuantificaciones mediante densitometría. Los valores se expresan en número de veces ensamblado (SC/Complejo libre) con respecto a su condición control (WT), a la que se asignó el valor de 1. Media \pm S.E.M (n=3); *U de Mann-Whitney*; *p*-valor \leq 0,1 numérico.

Según estos resultados, se puede afirmar que la eliminación de la PFKFB3 en los astrocitos provoca un mayor grado de ensamblaje del complejo I-III mitocondrial, lo que podría contribuir al aumento observado de la respiración mitocondrial en estos astrocitos carentes de la PFKFB3.

Los astrocitos PFKFB3 KO presentan menores tasas de producción de H₂O₂

Se sabe que la organización de la CTE en supercomplejos incrementa la eficiencia energética a expensas de una reducción en la producción de ROS (López-Fabuel et al. 2016). Por ello, se decidió comprobar las tasas de producción de peróxido de hidrógeno y los niveles mitocondriales de ROS.

En primer lugar, se determinó la tasa de producción de H_2O_2 extracelular mediante el uso de la sonda fluorescente AmplexRed® (**Figura 24A**). A continuación, se midió la concentración de ROS mitocondriales mediante la sonda MitoSOX® (**Figura 24B**). Puesto que esta sonda entra a favor de potencial de membrana, es conveniente llevar en paralelo una determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), mediante el uso de la sonda MitoProbe™ (**Figura 23C**). La fluorescencia de ambas sondas se evalúa mediante citometría de flujo.

(A) Producción de H_2O_2 (B) Superóxido mitocondrial (C) Potencial de membrana

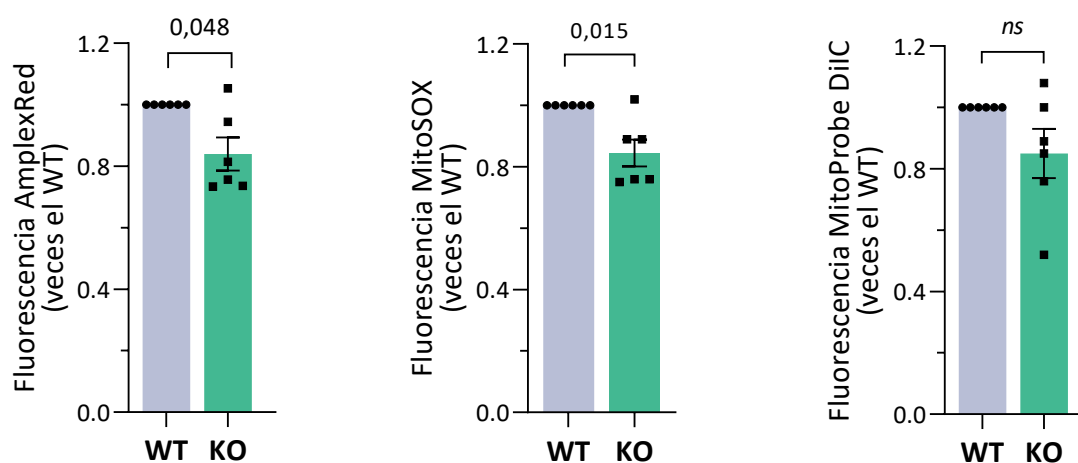


Figura 24. Evaluación de los niveles de producción de H_2O_2 , niveles de ROS mitocondriales y potencial de membrana mitocondrial. Se observa una disminución significativa en la cinética de liberación de H_2O_2 , mediante la detección fluorimétrica de la sonda Amplex Red®, en astrocitos PFKFB3 KO (KO) (A). En los astrocitos que carecen de PFKFB3 (KO) se produce una reducción significativa de los niveles de ROS mitocondriales detectadas mediante la sonda MitoSOX® (B). El potencial de membrana mitocondrial, determinado mediante el uso de la sonda MitoProbe™, no se altera significativamente en los astrocitos KO en comparación con los WT (C). Los valores se expresan en número de veces con respecto a la condición WT. Media \pm S.E.M (n=6); U de Mann-Whitney; p-valor \leq 0,1 numérico.

Los resultados muestran una reducción significativa de la producción de H_2O_2 extracelular, compatible con el mayor ensamblaje de la CTE. Con respecto a los ROS mitocondriales, también disminuyen significativamente en los astrocitos PFKFB3 KO en comparación con los WT. El potencial de membrana mitocondrial no varía significativamente con la ausencia de PFKFB3, aunque se aprecia una tendencia a la baja, que podría estar afectando levemente a la medida de MitoSOX® ya que se transporta a favor de potencial de membrana mitocondrial.

Una reducción en ROS puede afectar notablemente al papel protector de los astrocitos en su acoplamiento redox con las neuronas, comprometiendo su función y supervivencia.

III. Comprobación del modelo *knockout* condicional de PFKFB3 en ratón adulto

Delección genética de PFKFB3 en astrocitos de ratón adulto joven y maduro

Con objeto de estudiar las consecuencias funcionales y comportamentales de la remodelación metabólica observada en los astrocitos PFKFB3 KO cultivados *in vitro*, se llevó a cabo el mismo abordaje experimental de delección genética de PFKFB3 en un modelo *in vivo* murino. Para ello, se administró, en ratones macho *Pfkfb3*^{LoxP/LoxP}, un vector viral adenoasociado que expresa la recombinasa CRE gobernada bajo el promotor astrocítico GFAP (PHP.eB-GFaABC1D-CRE), por vía intravenosa a través del seno retroorbital. A esta condición la se denominó KO a lo largo del trabajo. Por otro lado, se inyectó, en animales hermanos de camada, el mismo vector, pero sin la secuencia de la recombinasa (pHp.eB-GFaABC1); esta condición se nombró como WT.

Con el propósito de evaluar la importancia temporal de la PFKFB3, se inocularon dos grupos de animales adultos de diferente edad. En primer lugar, animales de 3 meses, que se denominó grupo **joven** y, en segundo lugar, de 10-11 meses, que se designó como grupo **maduro**.

Comprobación de la delección genética de PFKFB3 en astrocitos de ratón

En primer lugar, se evaluó la eficiencia de la eliminación de PFKFB3 en hipocampo, un área de vital importancia en la cognición relacionada con procesos de memoria y aprendizaje, y cuya proporción de astrocitos GFAP positivos es relativamente alta (Z. Zhang *et al.*, 2019). Para ello, se realizó una inmunotransferencia con el anticuerpo anti-PFKFB3 en extractos de hipocampo de animales jóvenes de 4 meses, 1 mes después de la inoculación viral (**Figura 25**).

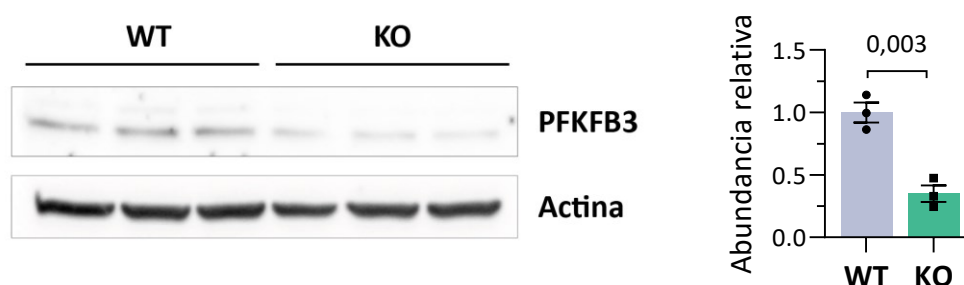


Figura 25. Análisis de la abundancia de PFKFB3 en hipocampo de animales WT y PFKFB3 KO. Se muestra la abundancia relativa de la PFKFB3 por inmunotransferencia tipo *Western Blot* de homogenado de hipocampo procedente de animales WT y KO. El histograma muestra la cuantificación por densitometría expresada en número de veces con respecto a la media de la condición WT, a la que se da el valor de referencia de 1. Se usa la actina como control de carga. Media ± S.E.M (n=3); *t* de Student de dos colas; *p*-valor ≤ 0,1 numérico.

Se observa una disminución significativa de los niveles proteicos de PFKFB3, que confirman el funcionamiento del vector viral. Con el objetivo de corroborar la especificidad celular de esta estrategia experimental, en trabajos previos del laboratorio donde se usó la misma estrategia con otro modelo KO condicional, se aislaron los astrocitos mediante separación inmunomagnética y se realizó una inmunodetección de marcadores específicos de distintos tipos celulares, comprobándose la bajada específica de la proteína de interés en astrocitos (Morant-Ferrando *et al.*, 2023).

El cerebro de los ratones PFKFB3 KO es menos glucolítico

Para confirmar la funcionalidad del modelo murino de eliminación de PFKFB3 en astrocitos, se decidió determinar el flujo glucolítico *ex vivo* de cerebro de ratones macho de 4,5 meses, esto es, 6 semanas después de la inoculación viral. Para ello, se incubaron secciones del hemisferio cerebral derecho, en fresco, con [3-³H]-glucosa y se determinó la producción de ³H₂O (**Figura 26A**). Los cerebros de los animales PFKFB3 KO presentan una reducción significativa de la velocidad glucolítica, de aproximadamente un 15% en comparación con los cerebros de los animales WT. Pese a que es una disminución discreta, hay que tener en cuenta que en las secciones no solo hay astrocitos, sino otros tipos celulares, incluidas células endoteliales, neuronas, microglía y oligodendrocitos, que presentan niveles variables de glucolisis (Xu *et al.*, 2014; Meyer y Rinholm, 2021). Este descenso de la vía glucolítica es, por tanto, muy relevante teniendo en cuenta el método empleado, lo que confirma la funcionalidad del modelo.

Flujo glucolítico *ex vivo*

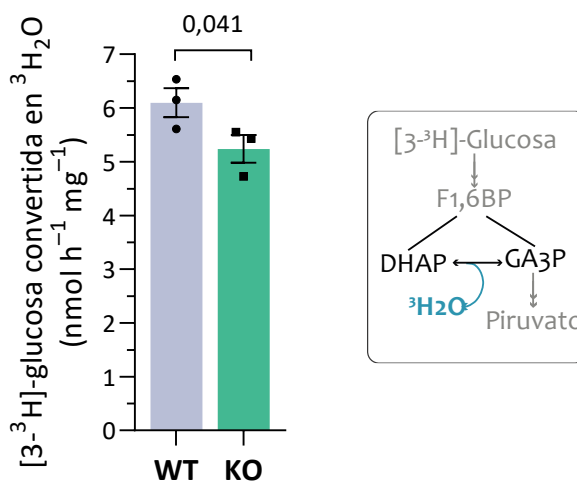


Figura 26. Determinación del flujo glucolítico en secciones de cerebro de animales WT y PFKFB3 KO. Se determinan los niveles de ³H₂O producidos a partir de [3-³H]-glucosa en secciones de cerebro, incubado en condiciones basales. Se observa una bajada significativa de un 15% de la glucolisis total del tejido en los animales PFKFB3 ko con respecto al WT. Media ± S.E.M (n=3), t de student de una cola; p-valor ≤ 0,1 numérico.

IV. Consecuencias funcionales de la eliminación de PFKFB3 en astrocitos de cerebro de ratón

Con objeto de comprobar las consecuencias funcionales y comportamentales que subyacen a la eliminación de la PFKFB3 en astrocitos de cerebro de ratón adulto, se llevaron a cabo varias pruebas de comportamiento, enfocadas a evaluar diferentes aspectos conductuales y cognitivos.

Debido a la notable implicación de la glucólisis en procesos relacionados con la memoria, se llevaron a cabo varias pruebas cognitivas dirigidas a evaluar esta función cerebral y así, poder evaluar el papel de la PFKFB3 en estas funciones cerebrales superiores (Suzuki *et al.*, 2011; Descalzi *et al.*, 2019; Murphy-Royal *et al.*, 2020; Cruz *et al.*, 2022). Asimismo, se realizó un estudio exhaustivo del comportamiento espontáneo del ratón para evaluar las capacidades motoras, exploratorias y conductas asociadas con fenotipos de miedo o ansiedad. Las pruebas detalladas a continuación se evaluaron **2 meses después** de la inoculación del vector viral.

Los animales PFKFB3 KO presentan déficits de memoria

En primer lugar, se sometieron los animales a la prueba de reconocimiento de nuevos objetos (**Figura 27**). Se analizó el índice de discriminación por el objeto novedoso tras una familiarización previa con dos objetos iguales [ver apartado 17.2 de *Materiales y Métodos*].

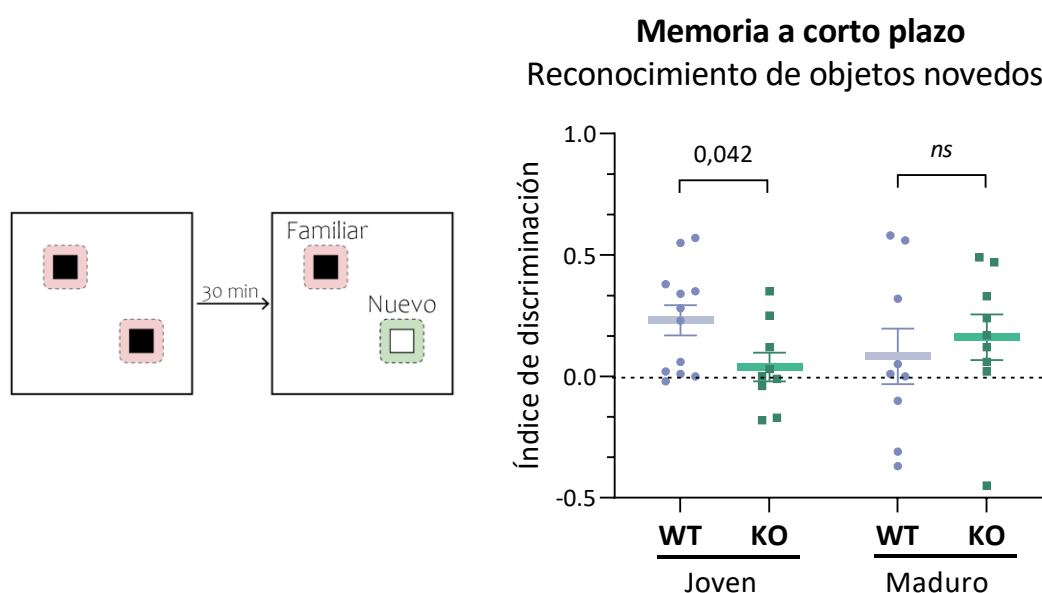


Figura 27. Análisis de la memoria a corto plazo de los ratones WT y PFKFB3 KO jóvenes y maduros con la prueba de reconocimiento de objetos novedosos. Se muestra el índice de discriminación [(Tiempo explorando Objeto Nuevo – Tiempo explorando Objeto Familiar)/(Tiempo total de exploración)], que en animales jóvenes es significativamente menor en los KO. No se encontraron diferencias significativas entre animales maduros. Media ± S.E.M. (n=9-12); t de Student; p-valor ≤ 0,1 numérico; ns = no significativo.

Se observa que los animales PFKFB3 KO jóvenes no presentan una preferencia por el nuevo objeto, probablemente por su incapacidad para recordar el objeto familiar anteriormente mostrado. Estos resultados confirman una pérdida de memoria a corto plazo. Con respecto a los animales maduros, no se observan diferencias entre ambos genotipos. Si bien hay que tener en cuenta que existe una mayor variabilidad en este grupo de estudio posiblemente debido a que se trate de una prueba demasiado restrictiva para la edad de los animales.

Posteriormente, se analizó la memoria de trabajo, para lo que se empleó el laberinto en Y (Y-maze), que evalúa la capacidad de retener y manipular información temporalmente para tareas cognitivas. En esta prueba se analiza el porcentaje de alternancias espontáneas (**Figura 28**). Esto es, el número de veces que el animal realiza tres entradas seguidas a los tres brazos sin repetir ninguno, normalizado frente al número total de posibles alternancias, que depende del número total de entradas. Como se puede observar en la **Figura 28**, no se aprecia ninguna diferencia significativa en el porcentaje de alternancias espontáneas, por lo que se puede afirmar que los animales PFKFB3 KO no parece que presenten déficits en este tipo de memoria de trabajo en ninguna de las dos edades analizadas.

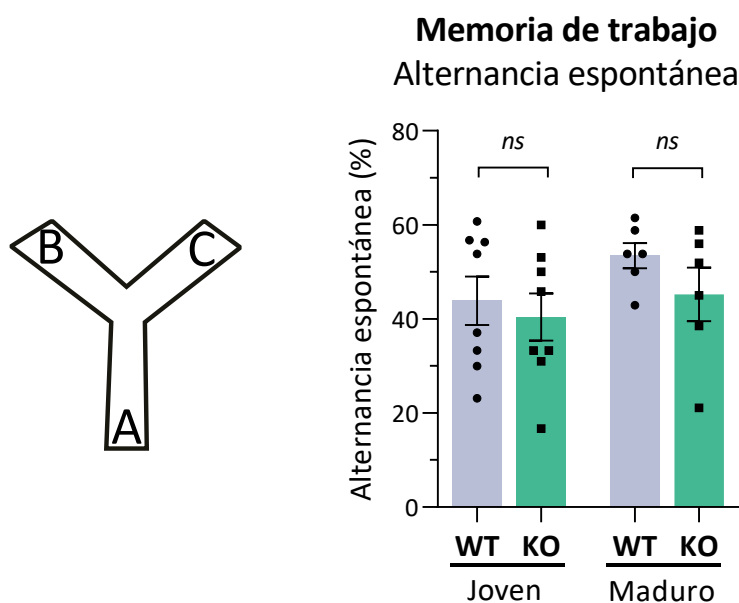


Figura 28. Análisis de las alternancias espontáneas de los ratones WT y PFKFB3 KO jóvenes y maduros con la prueba del laberinto en Y. Se muestra el porcentaje de alternancias espontáneas [alternancias correctas / (total entradas en brazos - 2)]. No se observan diferencias en ninguna de las condiciones. Media \pm S.E.M. (n=5-8); t de Student; ns = no significativo.

Finalmente, se realizó la prueba del laberinto de Barnes, que permite analizar tanto el aprendizaje como la memoria espacial a corto y largo plazo (**Figura 29**). Se evaluó el tiempo que el animal pasa en el cuadrante donde se encontraba el agujero de escape durante los

entrenamientos previos y que se ha retirado para la prueba de memoria espacial. La prueba se realiza después del último entrenamiento, el mismo día, para valorar el aprendizaje adquirido durante todo el proceso de entrenamiento. Esta prueba podría repetirse días o semanas después para evaluar la pérdida o conservación de lo aprendido, es decir, la consolidación de la memoria.

Se observa que los ratones jóvenes que carecen de PFKFB3 en los astrocitos, pasan menos tiempo en el cuadrante de escape, lo que indica que recuerdan peor el área de interés donde se encontraba el agujero de escape durante la fase de entrenamiento. Estos resultados sugieren que los animales PFKFB3 KO jóvenes presentan déficits en memoria espacial. Teniendo en cuenta que se considera un aprendizaje adecuado a un porcentaje superior al 25% (por probabilidad al dividir el cuadrante en cuatro áreas), parece que la memoria no está totalmente deteriorada, ya que, como se refleja en los mapas de calor, son capaces de reconocer la zona de interés incluso mejor que los animales WT maduros. Con respecto a estos últimos, se comprueba que presentan un mayor deterioro de la memoria espacial en comparación con los animales jóvenes (p -valor = 0,003; no mostrado en la figura), aunque no se encuentran diferencias significativas entre ambos genotipos.

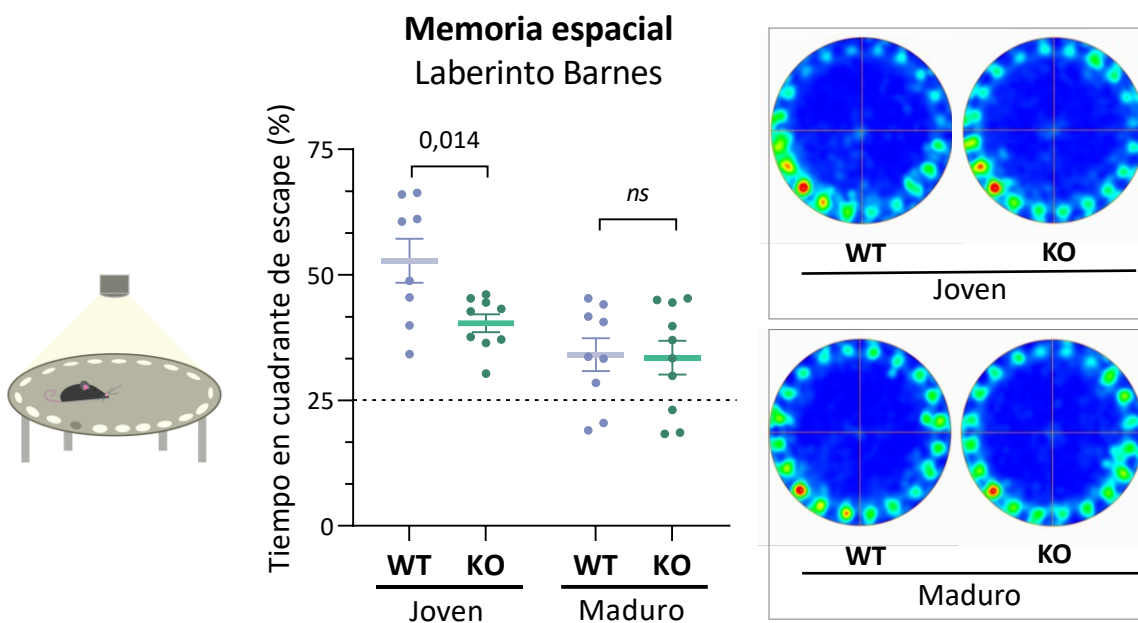


Figura 29. Evaluación de memoria espacial de los ratones WT y PFKFB3 KO jóvenes y maduros con la prueba del laberinto Barnes. Se muestra el porcentaje de tiempo en el cuadrante donde se encuentra el agujero de escape y los mapas de calor espaciotemporales que ilustran el tiempo promedio de cada genotipo durante la prueba. Los animales PFKFB3 KO (KO) jóvenes pasan menos tiempo en el cuadrante de escape, indicando pérdida de memoria espacial. No se observan diferencias entre los animales maduros. Media \pm S.E.M. ($n=8-9$); t de Student; p -valor $\leq 0,1$ numérico; ns = no significativo.

En vista a estos resultados, se puede confirmar que la eliminación de PFKFB3 en los astrocitos provoca una alteración de la memoria espacial únicamente en ratones jóvenes. Por tanto, parece que la función de la PFKFB3 es esencial para el mantenimiento de la memoria en adultos jóvenes, pero va perdiendo relevancia a medida que los ratones van envejeciendo.

Los animales con la deleción genética de PFKFB3 presentan alteraciones en la conducta

Se quiso evaluar la capacidad y coordinación motora de los animales, cuya alteración podía afectar a la realización del resto pruebas comportamentales. Para ello, se sometieron a los animales a la prueba de Rotarod y se evaluó la latencia a la caída (**Figura 30**). De estos resultados se concluye que los animales PFKFB3 KO no presentan alteraciones en la coordinación motora que pudieran interferir con la correcta realización de otras pruebas de comportamiento.

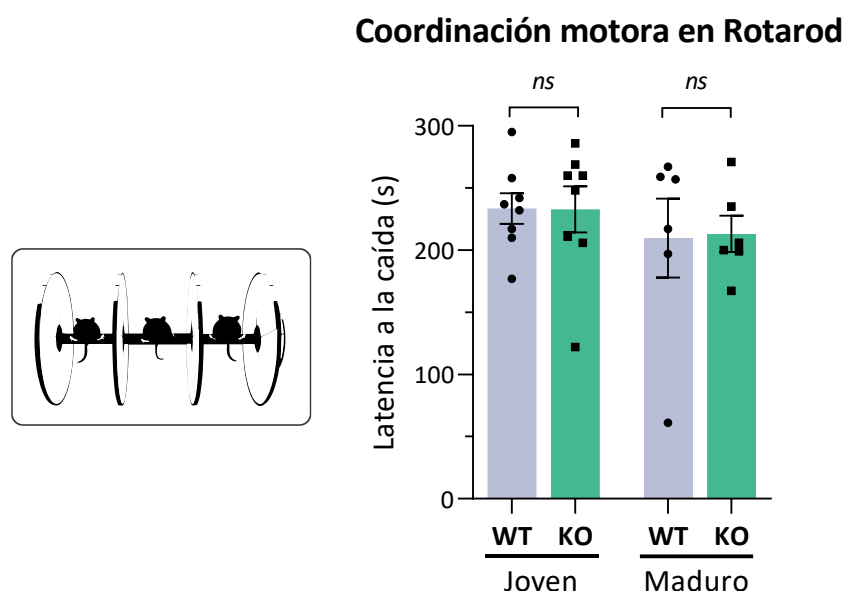


Figura 30. Evaluación de la coordinación motora de los ratones WT y PFKFB₃ KO jóvenes y maduros en el Rotarod. Se muestra la latencia a la caída como parámetro de evaluación de la coordinación motora en el Rotarod. No se observan diferencias significativas entre ambos genotipos en ninguna de las edades analizadas. Media ± S.E.M. (n=6-8); *t* de Student; ns = no significativo.

Todos los ratones se sometieron a la prueba de campo abierto u *Openfield* (**Figura 31**), utilizada para evaluar la capacidad exploratoria espontánea y fenotipos emocionales como el miedo y la ansiedad. Para ello, se puede examinar el tiempo y la distancia que los ratones pasan en cada área de la caja de campo abierto. La superficie se segmenta en tres zonas: borde, intermedia y centro. Un mayor tiempo o distancia recorrida en la zona del borde se considera característico de comportamientos ligados a la ansiedad o al miedo, dado que esta zona les

confiere una sensación de mayor protección (Seibenhener y Wooten, 2015). Para el análisis de los resultados, se emplearon únicamente las zonas de centro y borde, excluyendo la zona intermedia, que simplemente se utilizó como área de separación física de las otras dos.

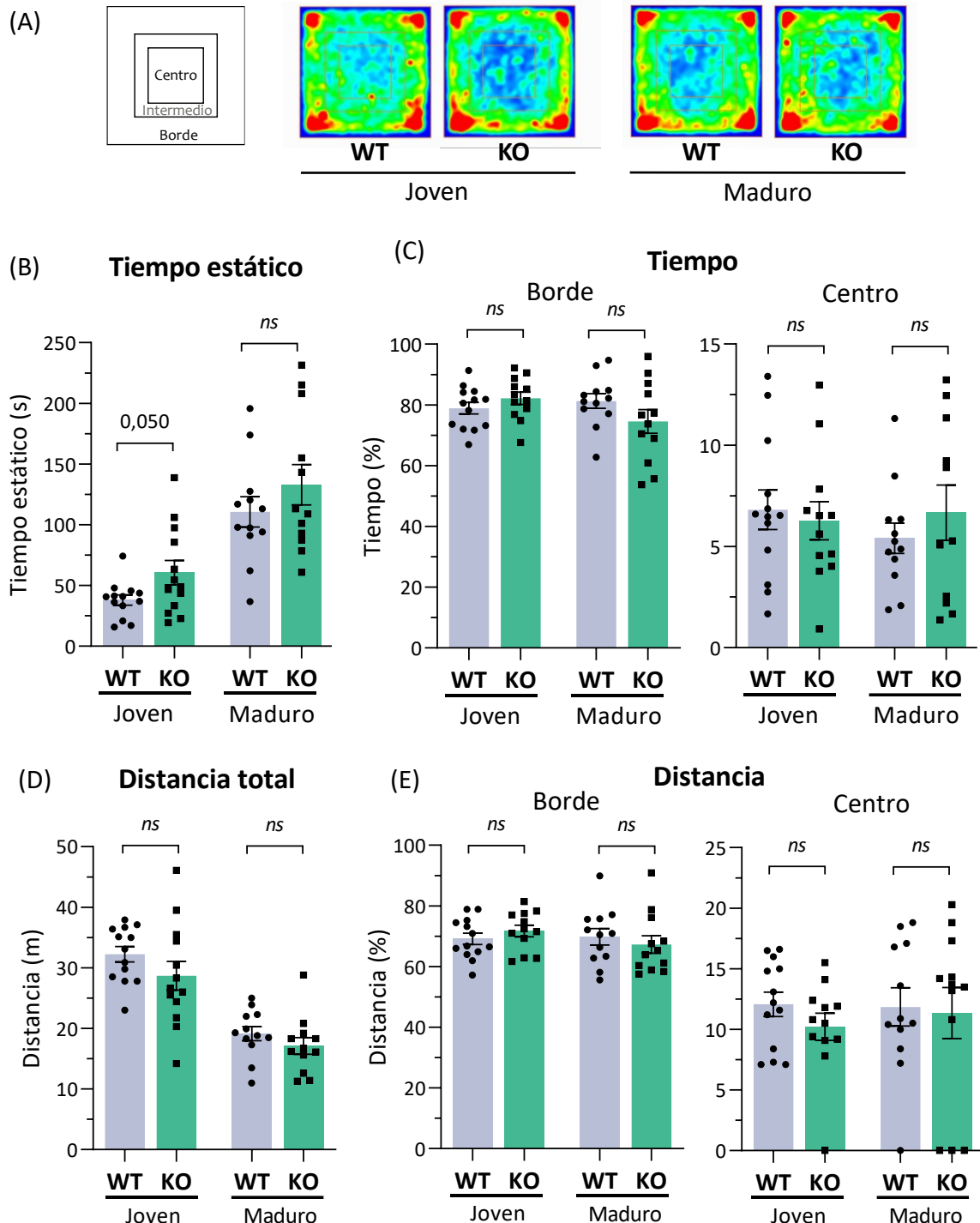


Figura 31. Análisis de la capacidad exploratoria espontánea de ratones WT y PFKFB3 KO jóvenes y maduros en la prueba de campo abierto (*Openfield*). Se muestran los mapas de calor espaciotemporales que ilustran el tiempo promedio de cada genotipo durante la prueba (A), el tiempo que permanecen estáticos o *freezing* (B), el porcentaje de permanencia en centro y borde (C) de la caja, distancia total recorrida (D), y el porcentaje de distancia recorrida en centro y en borde (E) con respecto a la distancia total recorrida. Media \pm S.E.M. (n=11-13); *t* de Student; *p*-valor \leq 0,1; ns = no significativo.

No se observan diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados para ninguna de las condiciones, a excepción del tiempo estático o *freezing* (**Figura 31B**), que es mayor en los animales PFKFB3 KO, por lo que no parece que estos animales presenten alteraciones graves relacionadas con un fenotipo de miedo o ansiedad. Por otro lado, se confirma que ambos grupos de edad se comportan de forma similar, pero la diferencia de edad se refleja en la distancia total recorrida que es menor en los maduros, y el tiempo estático, que es menor en los jóvenes (p -valor = $<0,0001$, jóvenes WT vs maduros WT). Estos resultados son esperables teniendo en cuenta que existe un aumento progresivo del sedentarismo relacionado con el envejecimiento (Tarantini *et al.*, 2019).

Además, se analizó el número de levantamientos, considerado un gesto natural de curiosidad y exploración animal. Estos levantamientos se registraron gracias a un sensor infrarrojo acoplado a la caja de *Openfield* (**Figura 32**).

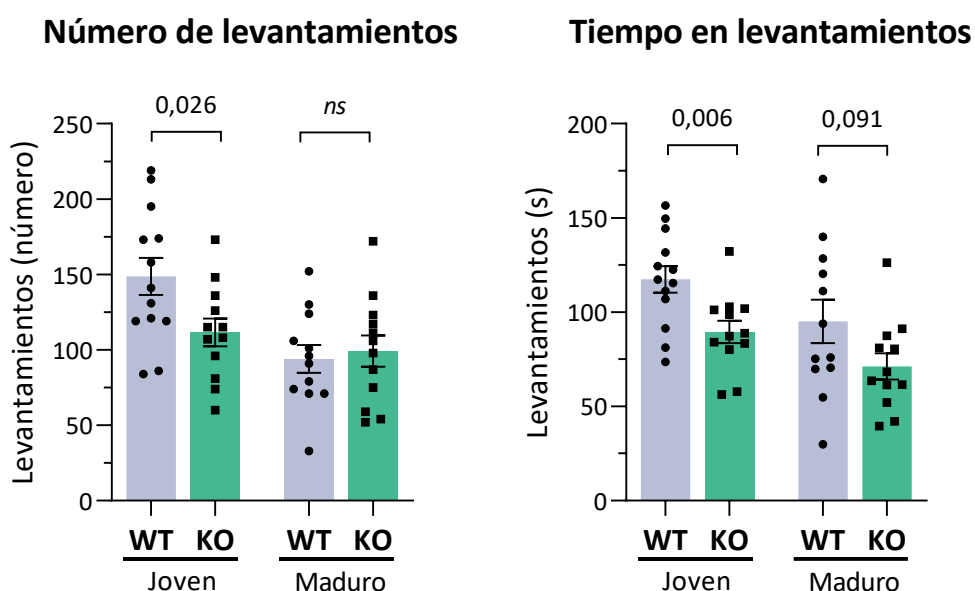


Figura 32. Registro de los levantamientos espontáneos de ratones WT y PFKFB3 KO jóvenes y maduros en la prueba de campo abierto. Se muestra el número levantamientos realizados por los animales y la duración total de los mismos. Media \pm S.E.M. ($n = 11-13$); t de Student; ns = no significativo.

Como se muestra en la **Figura 32**, los animales jóvenes PFKFB3 KO presentan una reducción significativa, tanto en el número como en la duración de los levantamientos realizados durante la prueba exploratoria. Con respecto a los animales maduros, no se observan diferencias significativas entre ambos genotipos, aunque sí una pequeña tendencia a la baja en la duración de los levantamientos de los animales PFKFB3 KO. Además, de nuevo se observan diferencias tanto en número como en el tiempo de los levantamientos entre jóvenes y maduros WT (p -valor = 0,002 y 0,024, respectivamente).

Descartando un problema a nivel motor, según los datos de Rotarod mostrados en el apartado anterior, estos resultados podrían apoyar la existencia de una posible alteración en la capacidad exploratoria de los animales PFKFB3 KO jóvenes. Sin embargo, las alteraciones en este parámetro no son específicas de capacidad exploratoria y podrían estar influenciadas por otro tipo de conductas. Por esta razón, sería necesario corroborar esta posible alteración en la capacidad exploratoria mediante otro tipo de pruebas comportamentales.

Con objeto de profundizar en el estudio del comportamiento exploratorio, se realizó una variante de la prueba de *Openfield*, pero en este caso usando una estructura agujereada llamada Caja con Agujeros o *Hole board*, donde el animal puede introducir la cabeza para explorar (Figura 33).

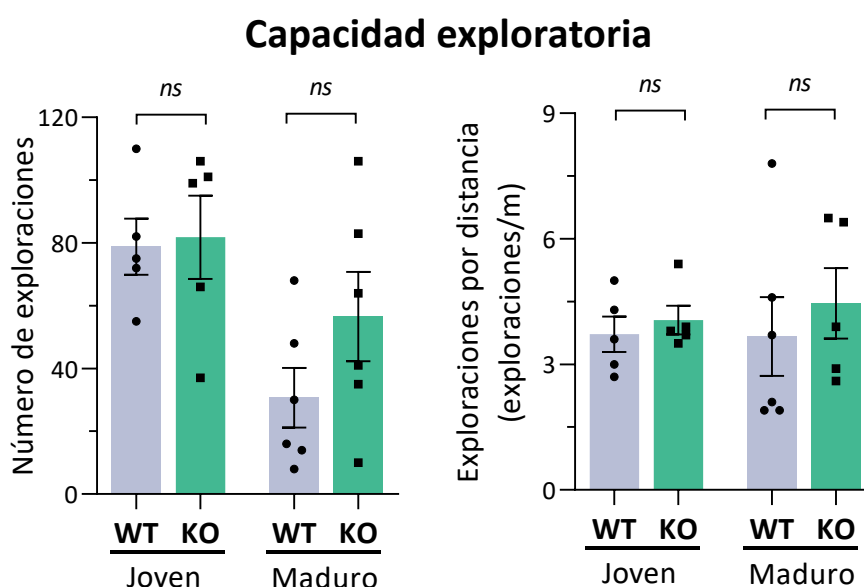


Figura 33. Análisis de la capacidad exploratoria en la Caja de Agujeros o *Hole board* en ratones WT y PFKFB3 KO jóvenes y maduros. Se muestra la capacidad exploratoria calculada como número total de exploraciones de los agujeros o como número de exploraciones de los agujeros normalizadas por la distancia recorrida individualmente. No se encuentran diferencias significativas entre ambos genotipos a ninguna de las edades analizadas. Media \pm S.E.M. (n=5-6); t de Student; ns = no significativo.

Analizando el número de exploraciones de los agujeros, no se encontraron diferencias significativas entre ambos genotipos, en ninguna de las dos edades de estudio. Por tanto, se puede confirmar que la capacidad exploratoria no está excesivamente afectada en los animales que carecen de PFKFB3 en sus células astrocíticas, a juzgar por los resultados obtenidos de las pruebas de *Openfield* y *Hole board*.

Debido a que no se observó ningún fenotipo emocional relacionado con el miedo o la ansiedad con la prueba de *Openfield*, se decidió someter a los animales a una prueba más agresiva, la

de la Caja Blanca/Negra o *Black & White*, para discriminar con mayor exactitud este tipo de conductas. Para ello, se colocaron los animales en una caja con dos estancias, una iluminada y transparente, y otra más oscura y opaca (**Figura 34**). La tendencia natural del animal es la exploración, pero un animal más miedoso pasará menos tiempo en la zona iluminada y transparente, donde está más expuesto y desprotegido.

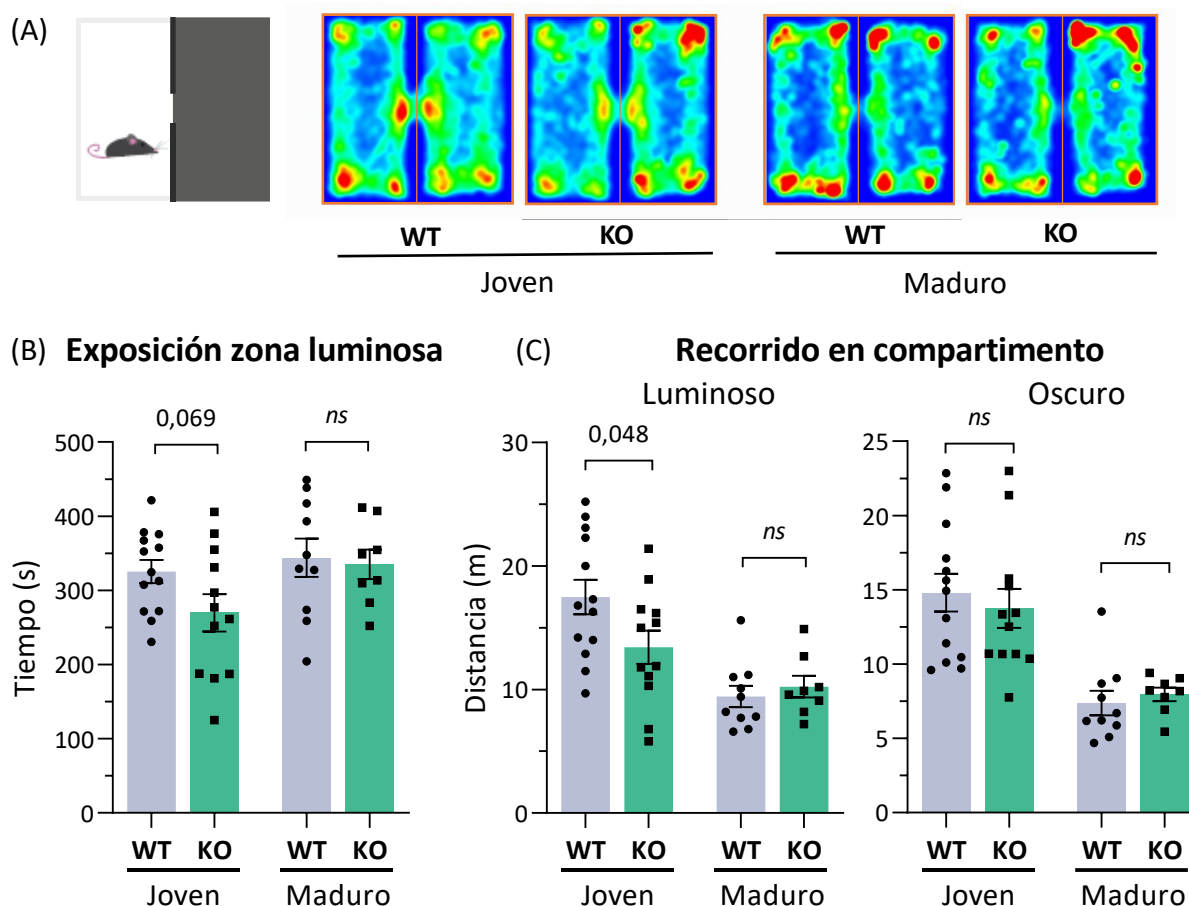


Figura 34. Evaluación del fenotipo de miedo/ansiedad en ratones WT y PFKFB3 KO jóvenes y maduros con la prueba de la Caja Blanca/Negra o *Black & White*. Se muestran los mapas de calor espaciotemporales que ilustran el tiempo promedio de cada genotipo durante la prueba, el tiempo que el ratón pasa en la zona luminosa, y la distancia recorrida en ambas zonas, luminosa y oscura. Se observa una disminución, cercana a la significatividad, en el tiempo transcurrido en la zona luminosa de los animales PFKFB3 KO jóvenes en comparación con los WT, que alcanza la significatividad si se compara la distancia recorrida en esa zona, pero no en la oscura. Media \pm S.E.M. ($n=8-13$); *t* de Student; p -valor $\leq 0,1$ numérico, ns = no significativo.

Como se muestra en la **Figura 34**, los animales PFKFB3 KO jóvenes muestran una tendencia no significativa hacia una menor permanencia en la zona transparente en comparación con los animales WT. Si se compara el recorrido en los dos compartimentos, estos mismos animales recorrieron significativamente menor distancia en la zona luminosa, pero no se observa diferencias entre ambos genotipos en la distancia recorrida en la zona oscura. Con estos resultados se puede interpretar que los animales PFKFB3 KO presentan ciertas alteraciones

conductuales que conllevan a un fenotipo leve de miedo o ansiedad. En cuanto a los animales maduros no existen diferencias significativas entre genotipos en ninguno de los parámetros evaluados.

Con todos estos datos, se puede concluir que el grupo de animales PFKFB3 KO jóvenes presentan un leve fenotipo de miedo o ansiedad, el cual podría explicar la alteración de algunos parámetros de capacidad exploratoria de los animales, como es el caso de los levantamientos o el tiempo estático. A juzgar por los resultados, las alteraciones conductuales, observadas en los animales que presentan delección genética de la PFKFB3 en los astrocitos, podrían estar más relacionadas con un aumento del miedo o de la ansiedad, que con una disminución inherente de la predisposición a explorar. No obstante, la pérdida de PFKFB3 en astrocitos no parece alterar críticamente el fenotipo exploratorio o de miedo. Por otro lado, se vuelve a evidenciar que la función de la PFKFB3 en los astrocitos es clave, en edades tempranas, para preservar un bienestar conductual y un rendimiento cognitivo adecuado. Sin embargo, la glucólisis astrocítica parece que va perdiendo relevancia durante el envejecimiento, ya que no se observa ninguna alteración comportamental entre los animales adultos maduros.

V. Progresión de las consecuencias funcionales de la eliminación de PFKFB3 en astrocitos de cerebro de ratón joven

Con objeto de comprobar si la ausencia de PFKFB3 en los astrocitos, causa un deterioro progresivo en ratones jóvenes en relación con estos fenotipos exploratorios y emocionales, se realizaron estas mismas pruebas, pero **10 meses después** de la inyección del vector viral, es decir, a la edad de 13 meses.

La eliminación de PFKFB3 en astrocitos empeora el fenotipo exploratorio, pero no el de miedo/ansiedad a largo plazo

En primer lugar, se evaluó la coordinación motora de los animales con la prueba de Rotarod y se realizó la prueba de campo abierto para determinar su capacidad exploratoria (**Figura 35**).

Analizando la latencia a la caída en el Rotarod, no se observan diferencias significativas entre los animales WT y PFKFB3 KO, por lo que no parece que se produzca un deterioro de la coordinación motora con el envejecimiento asociado a la pérdida de la PFKFB3 astrocítica que pueda, además, afectar al resto de pruebas. Con respecto a la prueba de campo abierto,

tampoco aparecen diferencias significativas entre ambos genotipos con respecto al fenotipo emocional de miedo/ansiedad, pero se mantiene la marcada reducción en el número y duración de los levantamientos de los animales PFKFB3 KO en comparación con los WT.

10 meses después de la inyección

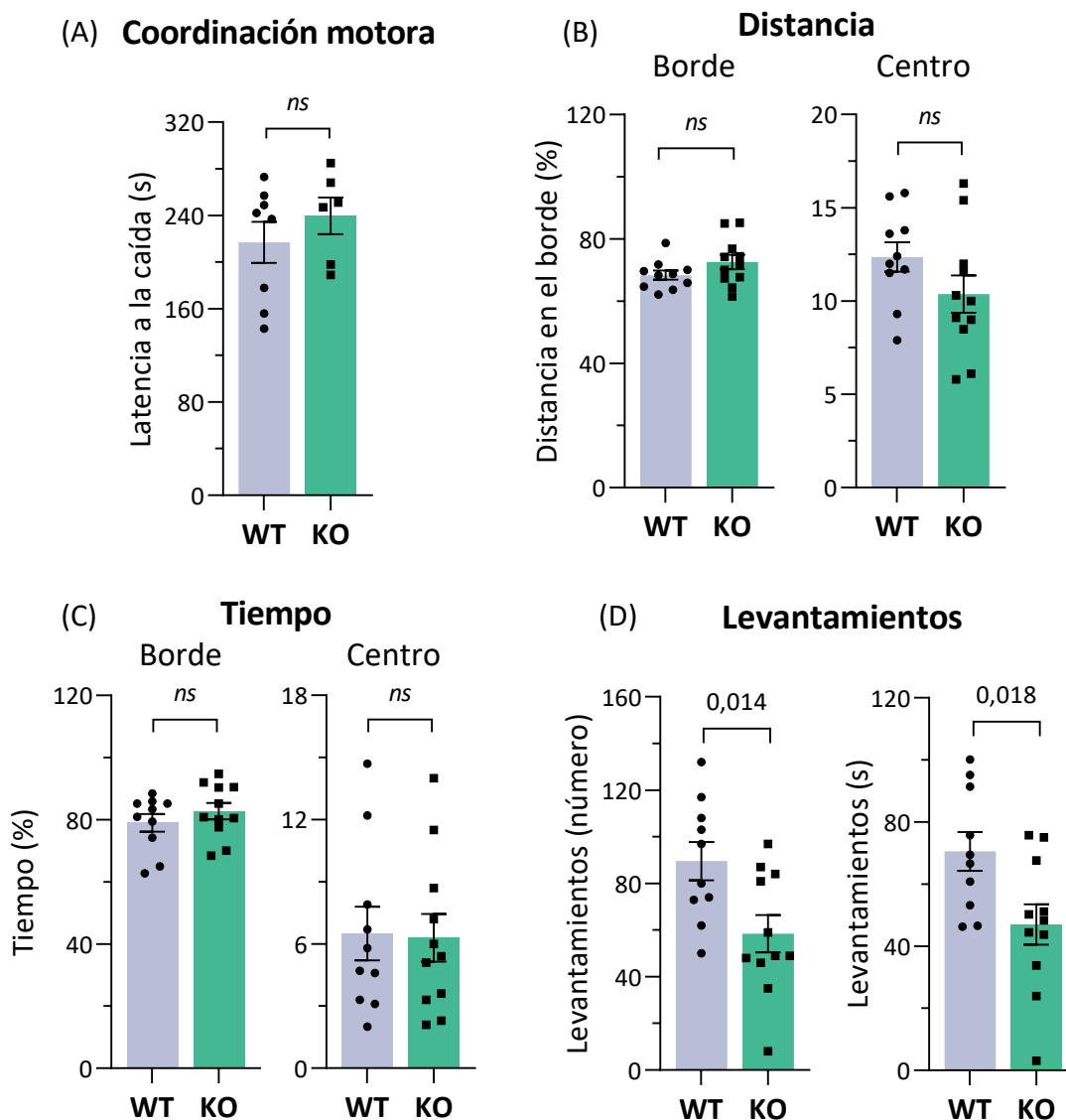


Figura 35. Evaluación de la coordinación motora y el comportamiento exploratorio espontáneo de ratones jóvenes WT y PFKFB3 KO, 10 meses después de la inoculación viral. Se muestra la latencia a la caída en la prueba de Rotarod (A), sin diferencias significativas entre ambos genotipos. En la prueba de campo abierto, se muestran los parámetros de porcentaje de distancia recorrida en borde y centro (B), los porcentajes de tiempo en borde y centro (C) y los levantamientos, tanto el número como el tiempo total de duración (D). Se observan diferencias significativas entre ambos genotipos, exclusivamente en el número y duración de los levantamientos, que son menores en los animales PFKFB3 KO en comparación con los WT. Media \pm S.E.M. ($n=6-8$ en Rotarod y $n=9$ en Openfield); t de Student; p -valor $\leq 0,1$ numérico; ns = no significativo.

A continuación, se sometieron a los animales a la prueba de *Hole board* (Figura 36A) y a la de la Caja Blanca/Negra (Figura 36B) con objeto de monitorizar la evolución de los fenotipos exploratorio y de miedo/ansiedad a largo plazo. Como se observa, los animales PFKFB3 KO

presentan una reducción estadísticamente significativa en el número de exploraciones totales realizadas en la prueba de *Hole board*, lo que indica una menor capacidad exploratoria de estos animales en comparación con los WT. Si se compara la distancia recorrida en la zona luminosa de la Caja Blanca/Negra (**Figura 36B**), se observa una disminución significativa de este parámetro en los animales que carecen de la PFKFB3 en los astrocitos, interpretado como un índice de mayor miedo o ansiedad.

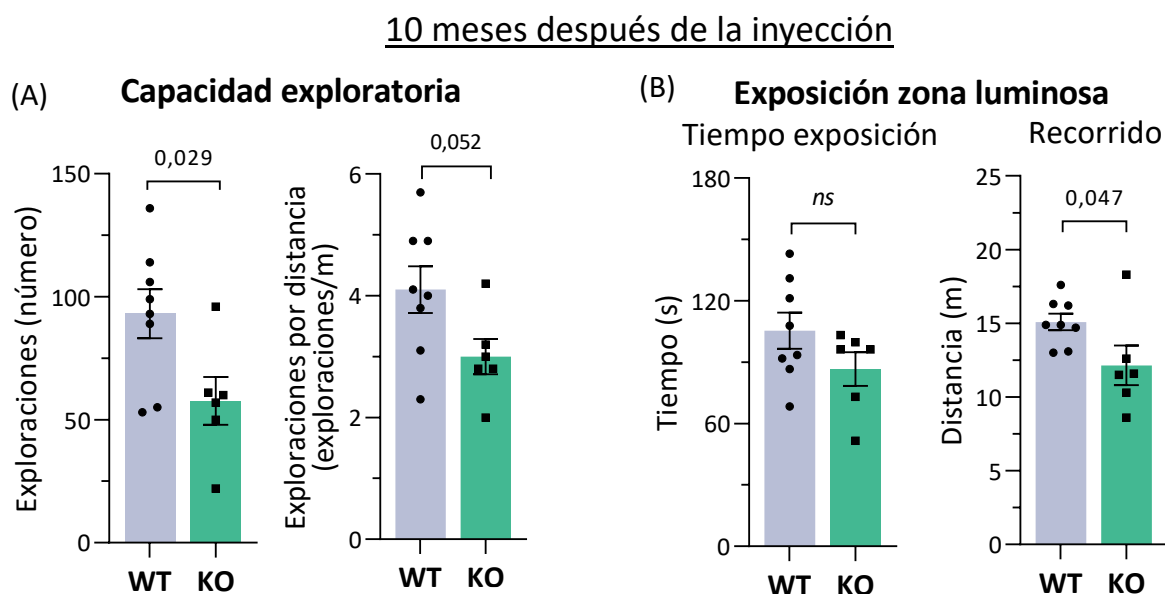


Figura 36. Análisis de la capacidad exploratoria y del fenotipo de miedo/ansiedad en ratones jóvenes WT y PFKFB3 KO, 10 meses después de la inoculación viral, utilizando las pruebas de *Hole board* y la Caja Blanca/Negra. Se muestra la capacidad exploratoria calculada como número de exploraciones totales o como número de exploraciones normalizadas por la distancia recorrida (A). Se representa el tiempo transcurrido y la distancia recorrida en la zona luminosa de la Caja Blanca/Negra (B). Los animales PFKFB3 KO presentan una reducción significativa en el número de exploraciones totales de los agujeros y en la distancia recorrida en la zona luminosa, en comparación con los animales WT. Media \pm S.E.M. (n=6-8); *t* de Student; *p*-valor \leq 0,1 numérico, ns = no significativo.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, se puede concluir que la eliminación a largo plazo de la PFKFB3 de los astrocitos tiene una mayor repercusión sobre el fenotipo exploratorio que sobre el fenotipo emocional de miedo/ansiedad. Esto se deduce porque, después de esta evaluación comportamental, 10 meses tras la eliminación de la PFKFB3, se observa un agravamiento del fenotipo exploratorio en comparación con los animales que se analizaron 2 meses tras la supresión de esta enzima glucolítica. Esto no ocurre con el fenotipo de miedo/ansiedad que se mantiene prácticamente inalterado en los dos tiempos monitorizados – 2 y 10 meses después de la inoculación viral – tras la ausencia de PFKFB3 en astrocitos.

El deterioro progresivo contemplado en el fenotipo exploratorio, provocado por la carencia de PFKFB3 en los astrocitos, podría deberse a cambios estructurales y funcionales permanentes de estas células gliales y/o de las células neuronales vecinas.

VI. Cambios permanentes metabólicos y estructurales por la eliminación de PFKFB3 en astrocitos de cerebro de ratón adulto

Una vez corroborado el papel esencial que tiene la PFKFB3 astrocítica en el mantenimiento de un óptimo bienestar conductual y de un rendimiento cognitivo adecuado en ratones adultos jóvenes, se decidió comprobar las posibles alteraciones metabólicas y morfológicas que sustentan estos defectos comportamentales.

La eliminación de la PFKFB3 en astrocitos influye en el metabolismo cerebral

Metabolismo general del cerebro

En primer lugar, se determinaron los niveles de glucógeno cerebral, para comprobar los resultados observados en astrocitos en cultivo. Aunque existe una tendencia al incremento en el contenido de glucógeno en el cerebro de los ratones PFKFB3 KO frente a los WT, la diferencia no alcanza la significación estadística, lo que sugiere que la acumulación observada podría no tener relevancia funcional esencial *in vivo* (Figura 37).

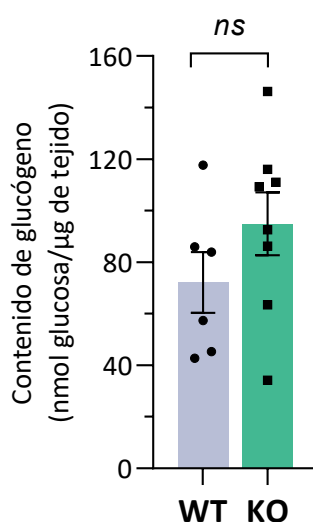


Figura 37. Determinación de los niveles de glucógeno basales en cerebro de ratones jóvenes. Se muestran los niveles de glucógeno en cerebro de ratones jóvenes. Aunque se observa una tendencia al incremento en glucógeno en los ratones KO, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre ambos genotipos. Media \pm S.E.M (n=6); t de Student de una cola; ns = no significativo.

Con objeto de analizar el efecto de la eliminación de PFKFB3 en astrocitos de ratón adulto

sobre el metabolismo general del cerebro, se realizó un estudio metabolómico no dirigido de extractos cerebrales de ratones WT y PFKFB3 KO. El estudio se llevó a cabo en cerebros de 6 animales jóvenes por grupo experimental tras 10 meses de la inoculación viral (13 meses de edad). Este análisis permitió detectar la abundancia relativa de 751 metabolitos diferentes.

La primera aproximación que se realizó con los datos obtenidos de la metabolómica fue un análisis de componentes principales (PCA) (**Figura 38A**). Este método estadístico reconstruye y posiciona los datos en una matriz, disminuyendo la cantidad de variables y destacando las más significativas. Se representa el componente principal que explica la mayor parte de la variabilidad (PC1) en el eje de abscisas, y el siguiente (PC2), en el eje de ordenadas. Este análisis confirmó que no hay una separación evidente entre genotipos según la abundancia de los metabolitos detectados, lo que demuestra que los cambios observados en el animal no se deben a excesivas alteraciones en el metabolismo general del cerebro. Además, se puede ver que una muestra WT se aleja del resto de la población; teniendo en cuenta que el PCA maximiza la varianza, no es sorprendente ni suficiente para considerarlo una muestra atípica o *outlier* que haya que retirar del análisis. Además, se realizó una matriz de correlación, que muestra la correlación entre diferentes metabolitos cuya abundancia relativa varía entre ambos genotipos, WT y PFKFB3 KO (**Figura 38B**).

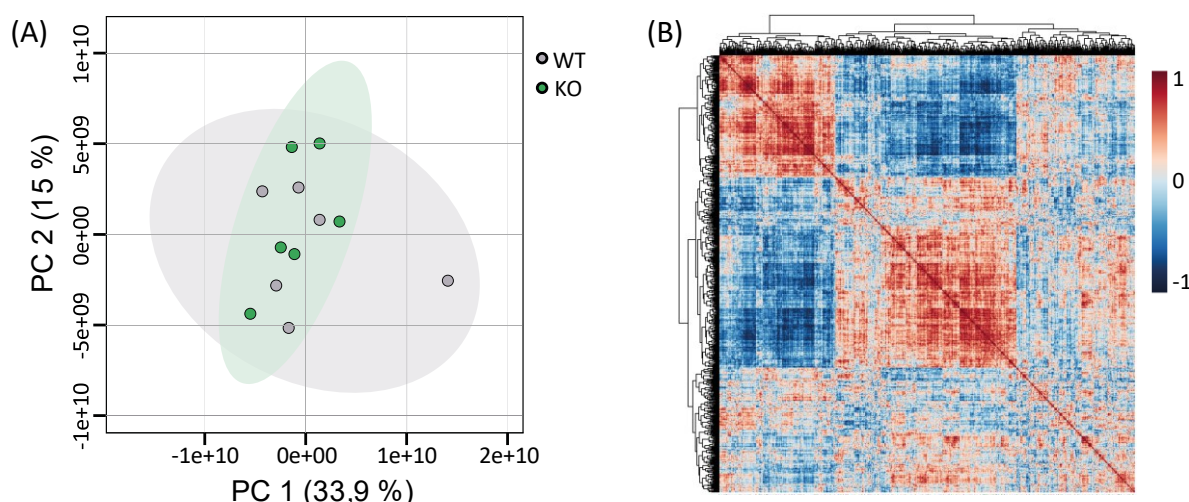


Figura 38. Análisis de componentes principales y matriz de correlación de 751 metabolitos cerebrales. Se representa el análisis de los componentes principales (PCA) (A), el cual no indica la existencia de dos poblaciones claramente diferenciadas, sugiriendo diferencias metabólicas moderadas entre las condiciones WT y PFKFB3 KO (KO). Se muestra la matriz de correlación (B) de todos los metabolitos detectados en el estudio, donde los colores rojo y azul reflejan correlaciones positivas y negativas respectivamente. Se observan algunas agrupaciones en color rojo, que posiblemente señalan una vía metabólica alterada o varias rutas estrechamente relacionadas. (n = 6)

De la totalidad de los metabolitos, se aprecia un alto grado de correlación entre algunos de

ellos, formando grupos o *clusters* de tonalidad roja, que probablemente identifican una misma vía metabólica alterada o varias rutas estrechamente relacionadas.

Tras esta visión general de los datos, posteriormente se realizó un análisis más pormenorizado de los metabolitos alterados. En la **Figura 39A** se representaron los 751 metabolitos detectados en función de su abundancia relativa y significatividad en los animales PFKFB3 KO frente a los WT. El *Volcano plot* muestra un total de 24 metabolitos significativamente alterados ($p\text{-valor} \leq 0,05$), de los cuales 8 están incrementados y 16 reducidos en los ratones PFKFB3 KO. Se señalan también los metabolitos cuya variación se corresponde con un $p\text{-valor} \leq 0,1$; en este caso aparecen 7 metabolitos incrementados, frente a 21 disminuidos en estos mismos animales. Estos resultados sugieren que la ausencia de PFKFB3, específicamente en los astrocitos, altera levemente el metabolismo cerebral.

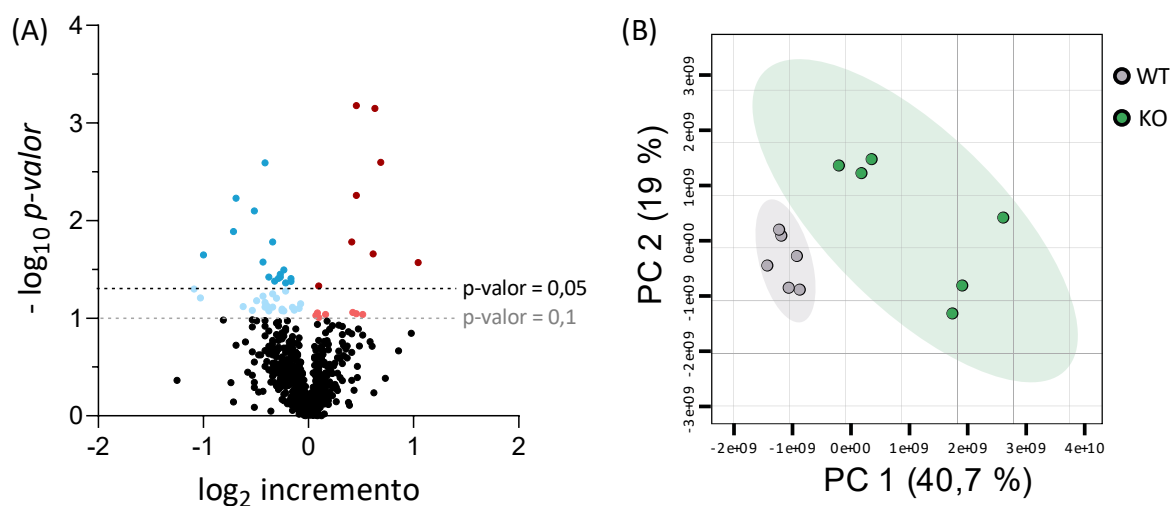
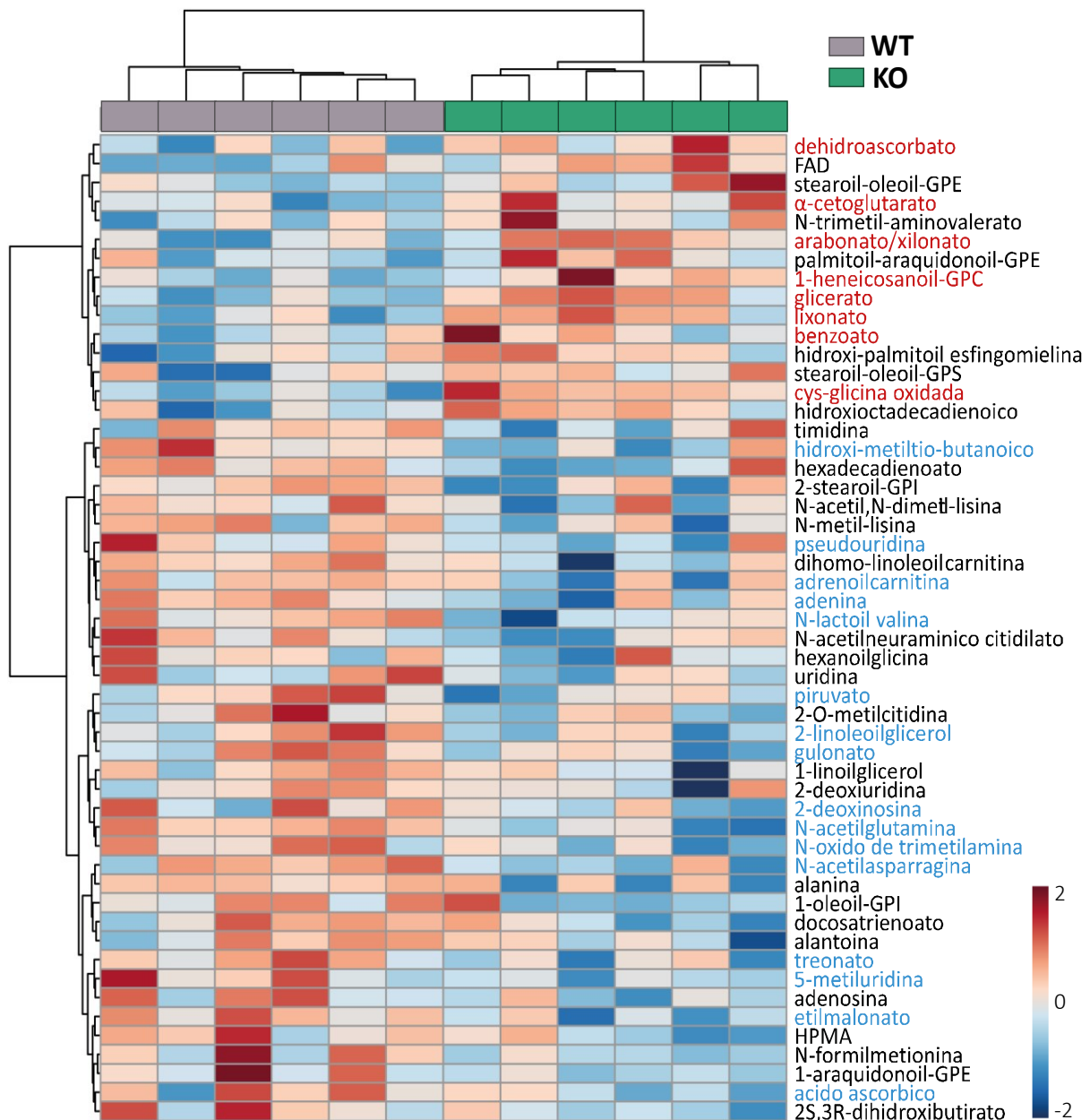


Figura 39. Evaluación de la abundancia relativa de los metabolitos cerebrales entre WT y PFKFB₃ KO. Se representa el *Volcano plot* que muestra la abundancia relativa de los metabolitos de los animales PFKFB₃ KO (KO) frente a los WT (A). Los 16 metabolitos disminuidos significativamente se señalan en azul oscuro, mientras que los 8 incrementados en rojo oscuro. En tonos más claros se indican los metabolitos significativamente diferenciales entre ambos genotipos pero con $p\text{-valor} \leq 0,1$. Se representa el análisis de componentes principales realizado con los valores de los 52 metabolitos alterados ($p\text{-valor} \leq 0,1$) y se evidencia la presencia de dos poblaciones claramente diferenciadas, reflejo de estas diferencias (B). (n = 6); *t* de Welch.

Se observan más metabolitos disminuidos que aumentados en los animales PFKFB3 KO en comparación con los WT, lo que es compatible con la disminución de la glucólisis, una ruta catabólica que proporciona numerosos intermediarios para otras vías metabólicas, además de proporcionar energía. Se trata de un número relativamente pequeño de metabolitos, lo que sugiere que no hay grandes cambios en el metabolismo general del cerebro entre ambos genotipos, como indicaba el PCA anterior. No obstante, pequeños cambios en determinados

metabolitos pueden provocar alteraciones funcionales relevantes. Este mismo efecto se puede ver en el mapa de calor (**Figura 40**), en el que se representan estos 52 metabolitos alterados ($p\text{-valor} \leq 0,1$) en los 6 animales independientes analizados por genotipo. Si se realiza de nuevo la matriz de componentes principales atendiendo solamente a estos metabolitos alterados (**Figura 39B**), se puede observar una clara separación de las muestras en dos poblaciones. Además, se visualiza que la agrupación WT es más homogénea que la PFKFB3 KO, donde se ve una mayor dispersión. Se evidencian dos pequeños grupos dentro de la población PFKFB3 KO, que se corresponden con los hermanos de la misma camada, lo que manifiesta la notable variabilidad interindividual en respuesta a la ausencia de PFKFB3 en astrocitos de cerebro de ratón adulto.



[Pie de figura en la siguiente página]

Figura 40: Mapa de calor de los 52 metabolitos alterados en el cerebro de los PFKFB3 KO frente a los WT. Representación del mapa de calor de la abundancia relativa de los 52 metabolitos alterados (p -valor $\leq 0,1$), en cada animal analizado de ambos genotipos, de los cuales 24 presentan cambios estadísticamente significativos (p -valor $\leq 0,05$), y cuyos nombres se resaltan en color. En azul se representan los metabolitos disminuidos significativamente en el PFKFB3 KO con respecto al WT y en rojo los incrementados. ($n = 6$); Prueba t de Welch. Abreviaturas: GPE (glicerolfosfaetalanolamina), GPI (glicerolfosfatidilinositol), GPC (glicerolfosfatidilcolina), GPS (glicerolfosfatidilserina).

En la **Figura 40** se muestra el mapa de calor con los 52 metabolitos alterados (p -valor $\leq 0,1$), en el que se señalan los metabolitos significativamente diferentes (p -valor $\leq 0,05$) entre ambos genotipos mediante la coloración del compuesto, en rojo los 16 metabolitos incrementados y en azul los 8 disminuidos en los animales PFKFB3 KO en comparación con los WT.

A continuación, para analizar más exhaustivamente cuáles son las vías metabólicas más afectadas en los animales PFKFB3 KO, se realizó la matriz de enriquecimiento de las rutas (Wieder *et al.*, 2021). El análisis de enriquecimiento de rutas se utiliza para determinar si un conjunto predefinido de metabolitos muestra una regulación significativamente mayor o menor (es decir, está "enriquecido") en comparación con una lista de referencia y con respecto al total de metabolitos significativamente distintos. En este caso se utilizó como referencia la lista proporcionada por la empresa *Metabolon* (Morrisville, EE. UU.), que contiene los 751 metabolitos detectados, agrupados en distintas rutas metabólicas (**Figura 41**).

Enriquecimiento de alteraciones en vías metabólicas

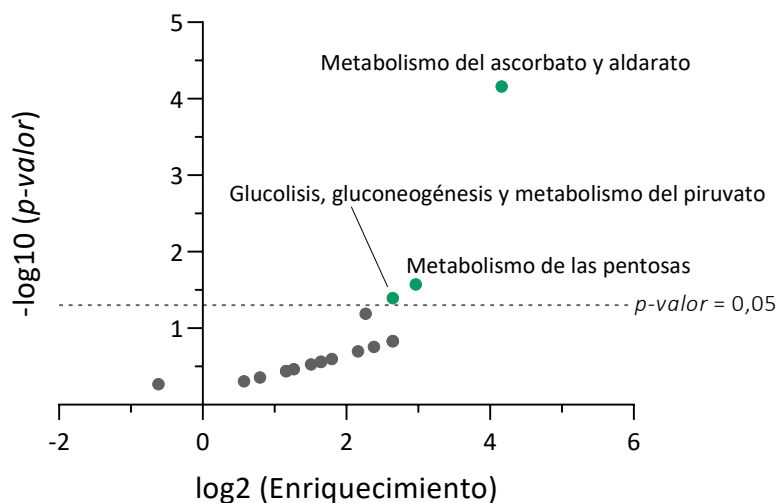


Figura 41. Enriquecimiento de las vías metabólicas alteradas en el cerebro de los animales PFKFB3 KO frente al de los WT. Se muestra un *Volcano Plot* de enriquecimiento de las rutas metabólicas alteradas, que relacionan los cambios encontrados en la abundancia relativa de los metabolitos entre ambos genotipos de estudio, WT y PFKFB3 KO. Se representa el \log_{10} del p -valor en el eje de ordenadas y el \log_2 del enriquecimiento. Se indican las rutas cuya modificación alcanza la significatividad (en verde). ($n = 6$); t de Welch.

A pesar de que en su clasificación cada metabolito se asigna a una sola ruta principal, simplificando la intrincada naturaleza del metabolismo, sigue siendo una herramienta útil, sobre todo en estudios donde numerosos metabolitos se ven afectados. En situaciones con alteraciones metabólicas limitadas, como en este estudio, este tipo de análisis nos proporciona un marco inicial para identificar diferencias clave, pero debemos posteriormente evaluar los metabolitos de forma más individualizada.

Dentro de la vía enriquecida de *Glucolisis, gluconeogénesis y metabolismo del piruvato* está incluida la alteración del piruvato y del glicerato (**Figura 41 y 42**). Se observa la reducción significativa de piruvato en los cerebros de los animales PFKFB3 KO, lo que confirma la disminución de la glucolisis y/o sugiere un mayor consumo de este metabolito por la mitocondria de los astrocitos y, posiblemente, de otros tipos celulares como las neuronas. El aumento en los niveles de glicerato, en el contexto de una glucólisis disminuida, podría ser consecuencia de alteraciones en las enzimas que regulan el glicerato (Park *et al.*, 2017).

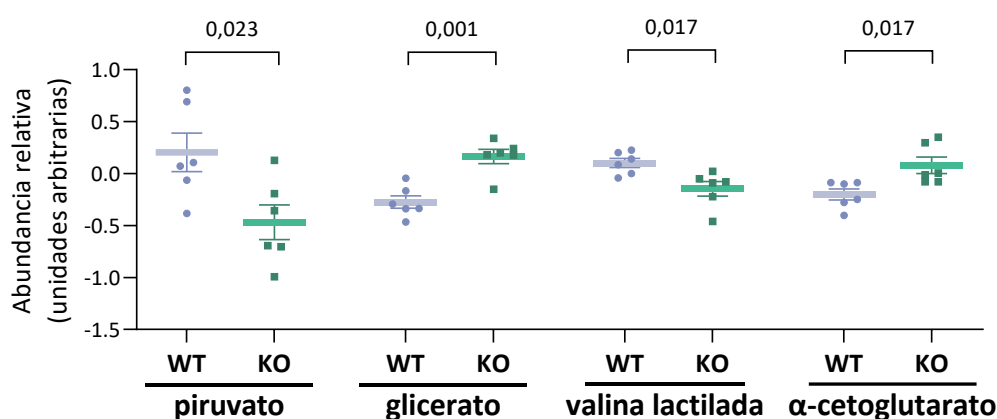


Figura 42. Alteraciones en la abundancia relativa de piruvato, glicina, valina lactilada y α-cetoglutarato. Se muestra la abundancia relativa de los metabolitos piruvato, valina lactilada y α-cetoglutarato, que están alterados significativamente entre el WT y el PFKFB3 KO. Media ± SEM (n = 6); t de Welch; p-valor ≤ 0,1 numérico.

En esta línea, se aprecia un descenso que ronda la significatividad (p -valor = 0,0502) de la alanina (**Figura 40**). En un escenario donde es compatible el descenso de la producción de piruvato por la glucólisis, los astrocitos pueden compensar aumentando la conversión de alanina a piruvato a través de la actividad de alanina transferasa (Parpura, Schousboe y Verkhatsky, 2014). Este piruvato adicional puede utilizarse para alimentar un ciclo de TCA hiperactivo dentro de los propios astrocitos o ser transferido a las neuronas para mantener su energía. Sin embargo, esta compensación no sería suficiente para contrarrestar completamente la deficiencia de piruvato a nivel cerebral.

Asimismo, se ve una disminución de valina lactilada, compatible con una reducción de lactato (**Figura 42**). Aparece también un aumento significativo de α -cetoglutarato, intermediario del TCA, que podría acumularse como consecuencia de la hiperactivación del ciclo en los cerebros de los animales que carecen de PFKFB3 en astrocitos (**Figura 42**).

En el análisis de enriquecimiento aparece el *metabolismo de las pentosas*, al encontrarse elevados tanto el arabonato/xilonato – la metodología no permite diferenciarlos – como el lixonato, relacionados con la oxidación de carbohidratos (Beer *et al.*, 2018). No son metabolitos cerebrales comunes en condiciones normales, por lo que su presencia puede ser indicativa de cambios metabólicos específicos o de interacciones con sistemas periféricos como la microbiota intestinal, ambos poco explorados y alejados del contexto de este trabajo.

Por otro lado, aparecen identificadas en el análisis metabolómico 4 moléculas relacionadas con el metabolismo de las purinas y pirimidinas que están disminuidas significativamente en los cerebros de los animales PFKFB3 KO en comparación con los de los animales WT, que son: 2'-deoxinosina, adenina, pseudouridina y 5-metiluridina (**Figura 43**).

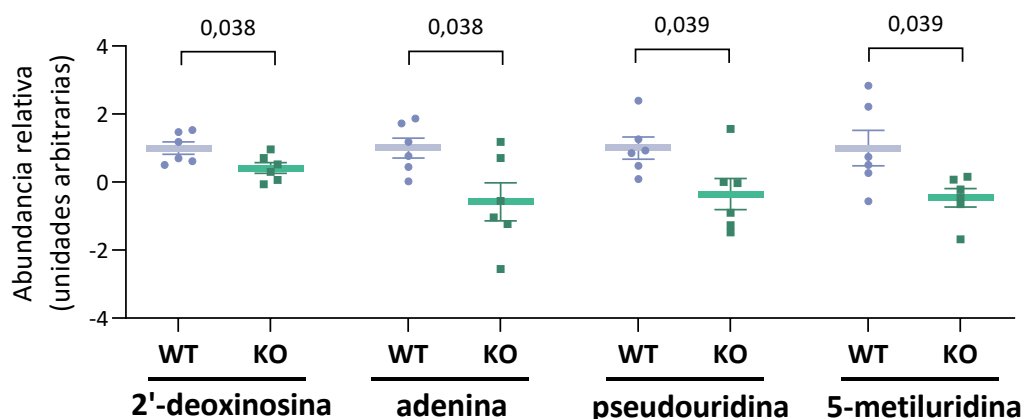


Figura 43. Alteraciones en la abundancia relativa de 2'-deoxinosina, adenina, pseudouridina y 5-metiluridina. Se muestra la abundancia relativa de los 4 metabolitos relacionados con el metabolismo de las purinas y pirimidinas: 2'-deoxinosina, adenina, pseudouridina y 5-metiluridina, disminuidos significativamente en los cerebros PFKFB3 KO con respecto a los WT. Media \pm SEM (n = 6); t de Welch; p-valor \leq 0,1 numérico.

Además, estos animales también presentan menor abundancia relativa de adenosina, uridina, timidina, 2-deoxiuridina y 2-O-metilcitidina en comparación con los animales WT, aunque esta diferencia no alcanza la significatividad estadística, siendo el *p-valor* \leq 0,1 (**Figura 40**). Por tanto, se puede deducir que existe una clara afectación de la síntesis o degradación de ácidos nucleicos en los animales PFKFB3 KO.

Por otra parte, la serina, cuya síntesis *de novo* se deriva de la ruta glucolítica en la vía

fosforilada, podría estar disminuida en los cerebros de los animales PFKFB3 KO, afectando a la síntesis de glicina y metionina. Un reflejo de esta afectación puede ser la disminución de los niveles de N-formil-metionina, hexanoilglicina, N-metil-lisina y N-dimetil-lisina (**Figura 40**). Además, se observa una disminución de hidroximetilbutanoico, un metabolito que puede servir de precursor para la metionina, apoyando la idea de una compensación para conseguir este aminoácido esencial ante la disminución de la producción de serina (**Figura 40**). Estas alteraciones también podrían afectar a la producción de nucleótidos, a la metilación y a otros procesos cruciales. Una disminución en la síntesis de purinas y pirimidinas, así como de neurotransmisores derivados de la serina, puede tener consecuencias graves, afectando desde la estructura básica del ADN y ARN hasta funciones complejas como la neurotransmisión y la defensa frente al daño oxidativo (Meunier *et al.*, 2016; Sinha *et al.*, 2020).

Paralelamente, se evidencian alteraciones relacionadas con el metabolismo oxidativo, concretamente a nivel del *metabolismo del ascorbato y aldarato* (**Figura 41**). Se observa una disminución significativa del ácido ascórbico en su forma reducida y, en contraposición, su aumento en la forma oxidada (o dehidroascorbato) (**Figura 44**) en los cerebros de los ratones PFKFB3 KO astrocito-específico. Aparecen también incluidos en esta vía el gulonato y treonato, disminuidos significativamente en el PFKFB3 KO (**Figura 44**). Mientras que el primero es un precursor de la síntesis de ácido ascórbico, el segundo es un producto de oxidación del mismo.

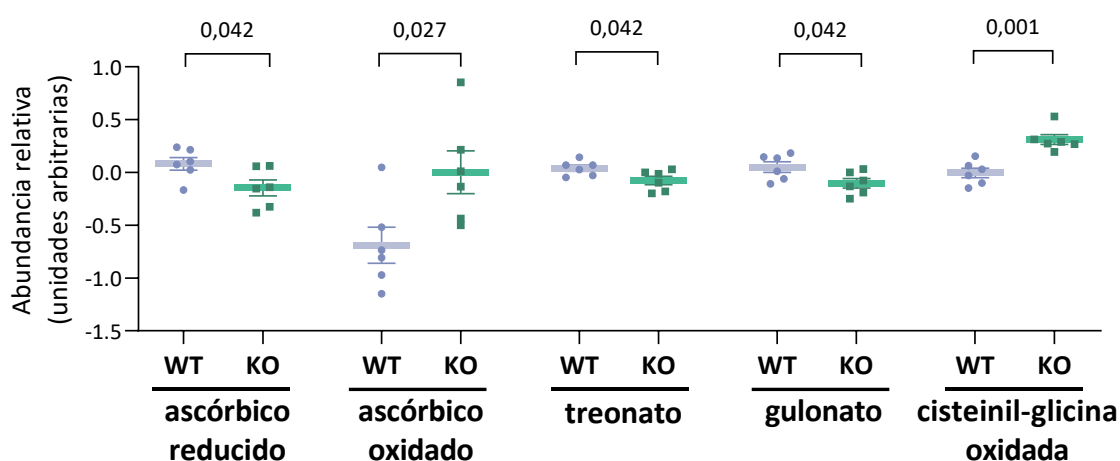


Figura 44. Alteraciones en la abundancia relativa del ácido ascórbico oxidado y reducido, treonato, gulonato y cisteinil-glicina oxidada. Se muestra la abundancia relativa de los metabolitos ácido ascórbico oxidado y reducido, treonato, gulonato y cisteinil-glicina oxidada, que están alterados significativamente entre los animales WT y los PFKFB3 KO, indicando una posible alteración del estado redox en aquellos animales que carecen de la PFKFB3 en los astrocitos (KO). Media ± SEM (n = 6); t de Welch; p-valor ≤ 0,1 numérico.

El ácido ascórbico o vitamina C es un potente antioxidante que protege a las células contra el daño oxidativo producido por el incremento de los radicales libres. En ratones puede ser

synetizado a partir de glucosa y participa en la regeneración del GSH, por lo que la disminución de su estado reducido podría estar relacionada con la alteración del estado redox celular (Rice, 2000). Se conoce un transporte de ácido ascórbico acoplado entre astrocitos y neuronas, que contribuye a la respuesta antioxidante ejercida por los astrocitos, que podría estar alterado en los animales PFKFB3 KO (Allaman, Bélanger y Magistretti, 2011).

Aparecen también alteraciones en los niveles de cisteinil-glicina oxidada, siendo más elevados en los animales PFKFB3 KO. Este metabolito proviene de la degradación del glutatión y puede estar oxidado o reducido. Un mayor estado de oxidación podría señalar una condición oxidativa generalizada. Además, está implicada en el metabolismo y regulación de los niveles del glutatión, un antioxidante clave (Dringen, Gutterer y Hirrlinger, 2000). En esta línea, se encontraron niveles menores de N-acetil-glutamina en estos mismos animales (**Figura 40**), que podrían indicar un mayor uso de la glutamina para la producción de glutatión, necesario para combatir el estrés oxidativo.

Todas estas observaciones contribuyen a evidenciar un mayor estado de oxidación en los cerebros de los animales PFKFB3 KO con respecto a los WT.

Mecanismo de acoplamiento oxidativo

Considerando la estrecha relación oxidativa entre astrocitos y neuronas y los resultados obtenidos tanto en la metabolómica como en los cultivos primarios de astrocitos carentes de PFKFB3, se quiso determinar el estado redox de los astrocitos y de las neuronas, *ex vivo*, por separado.

Para ello se realizó la disgregación del tejido cerebral y se dividió en dos fracciones, cada una destinada a la obtención de una población celular específica [ver apartado 7.2 de *Materiales y Métodos*]. Posteriormente, se incubaron ambas fracciones con la sonda AmplexRed®, que mide la producción de H₂O₂, y se determinó la fluorescencia (**Figura 45**). Como se puede observar, los astrocitos extraídos de los animales PFKFB3 KO presentan una reducción estadísticamente significativa de la cinética de producción de H₂O₂ en comparación con los astrocitos procedentes de los animales WT, confirmando los resultados obtenidos en cultivo primario. La reducción en los niveles de especies reactivas de oxígeno de los astrocitos debería conducir a una disminución de su respuesta antioxidante hacia las neuronas (Dringen, Pfeiffer y Hamprecht, 1999; Jiménez-Blasco *et al.*, 2015; Vicente-Gutierrez *et al.*, 2019). Sin embargo, no existen diferencias significativas en la producción de peróxido de hidrógeno neuronal entre

ambos genotipos. Es posible que los mecanismos intrínsecos neuronales sean capaces de compensar esa posible deficiencia en la respuesta antioxidante de los astrocitos.

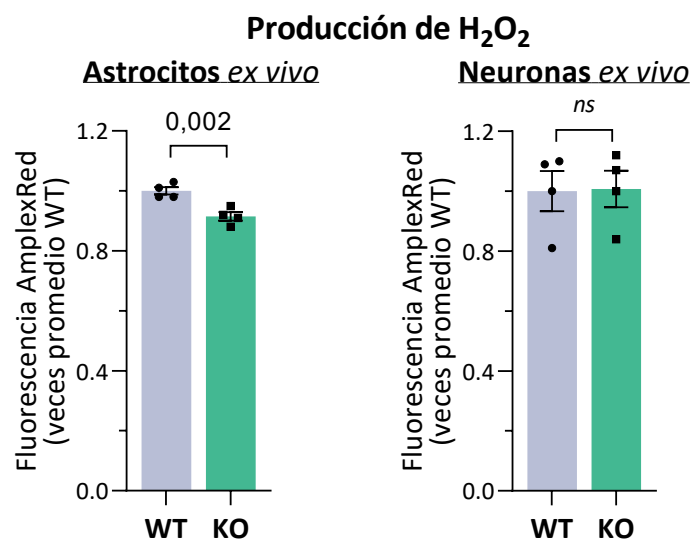


Figura 45. Evaluación de los niveles de producción de H₂O₂ en astrocitos y neuronas *ex vivo*. Cinética de producción de H₂O₂, mediante la detección fluorimétrica de la sonda Amplex Red® en astrocitos y neuronas *ex vivo*, procedentes de disgregación cerebral del cerebro de ratones del grupo joven y posterior separación inmunomagnética con la tecnología *Miltenyi*. En los astrocitos que carecen de PFKFB3 (KO) se produce una reducción significativa de la producción de H₂O₂, mientras que no hay diferencias en neuronas. Los valores se expresan en número de veces con respecto a la media de la condición WT. Media ± S.E.M (n=4); *t* de student de una cola para astrocitos y de dos colas para neuronas; *p*-valor ≤ 0,1 numérico; *ns* = no significativo.

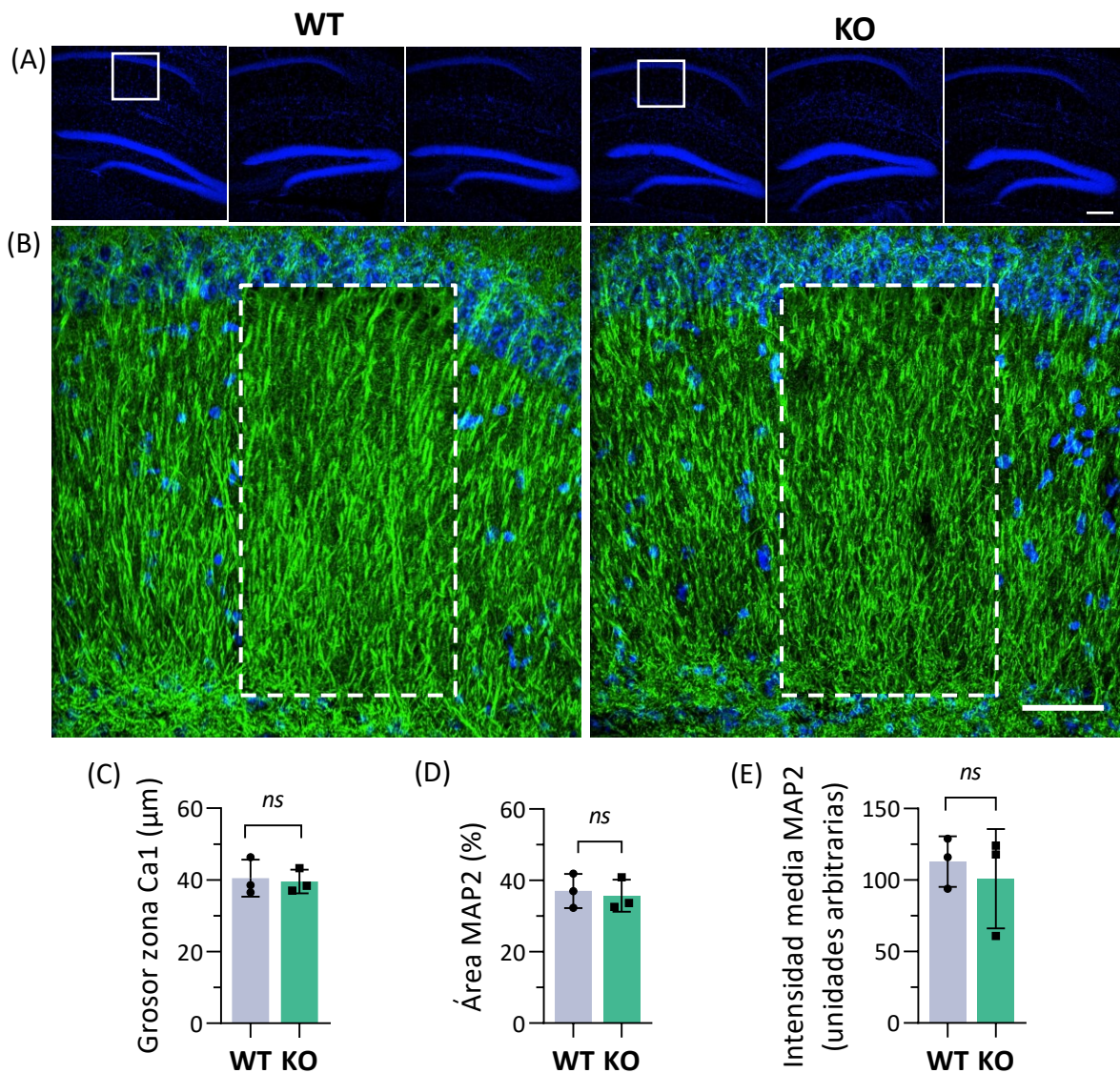
VII. La eliminación de la PFKFB3 en astrocitos altera la morfología de las células neurales

Para evaluar las posibles alteraciones a nivel de estructura y morfología de los diferentes tipos celulares presentes en el cerebro, se realizó una inmunohistoquímica de la región CA1 del hipocampo de 3 animales de cada condición, WT y PFKFB3 KO.

En primer lugar, se valoró el estado de las neuronas hipocampales. En la **Figura 46A** podemos observar la imagen general de los núcleos de los hipocampos de los 3 animales empleados por condición, que reflejan una estructura y distribución normal de la zona tanto en los WT como en los PFKFB3 KO. No se aprecian diferencias aparentes entre los animales. Esto indica que se ha partido de una uniformidad inicial, que no hay una pérdida notable de neuronas en esta área y que las muestras se seccionaron de manera semejante. Esta observación queda reflejada en la cuantificación de la medida del espesor de esa capa nuclear (**Figura 46C**).

En las imágenes ampliadas del hipocampo se observa parte de la región CA1, particularmente la capa del *estrato radiatum*, de los diferentes genotipos (**Figura 46B**). Se muestran los canales

para el DAPI y MAP2 (en verde), indicando una región solo con el marcaje de MAP2 (cuadro discontinuo) para destacar la estructura de las neuronales que recorren la capa. Aunque no se identificaron diferencias significativas ni en el área de ocupación neuronal (**Figura 46D**) ni en la intensidad media de la fluorescencia del MAP2 (**Figura 46E**), cualitativamente parece que la distribución de la proteína estructural MAP2 de las neuritas es diferente entre la condición WT y PFKFB3 KO. Es posible que los cambios metabólicos acaecidos en los animales sin PFKFB3 astrocítica tengan derivado en una alteración neuronal que termine por provocar una cierta desestructuración en sus prolongaciones que contribuyan a la alteración funcional observada en las pruebas de comportamiento. No obstante, es necesario encontrar un método cuantitativo más adecuado, o un marcaje neuronal diferente, para corroborar esta observación.

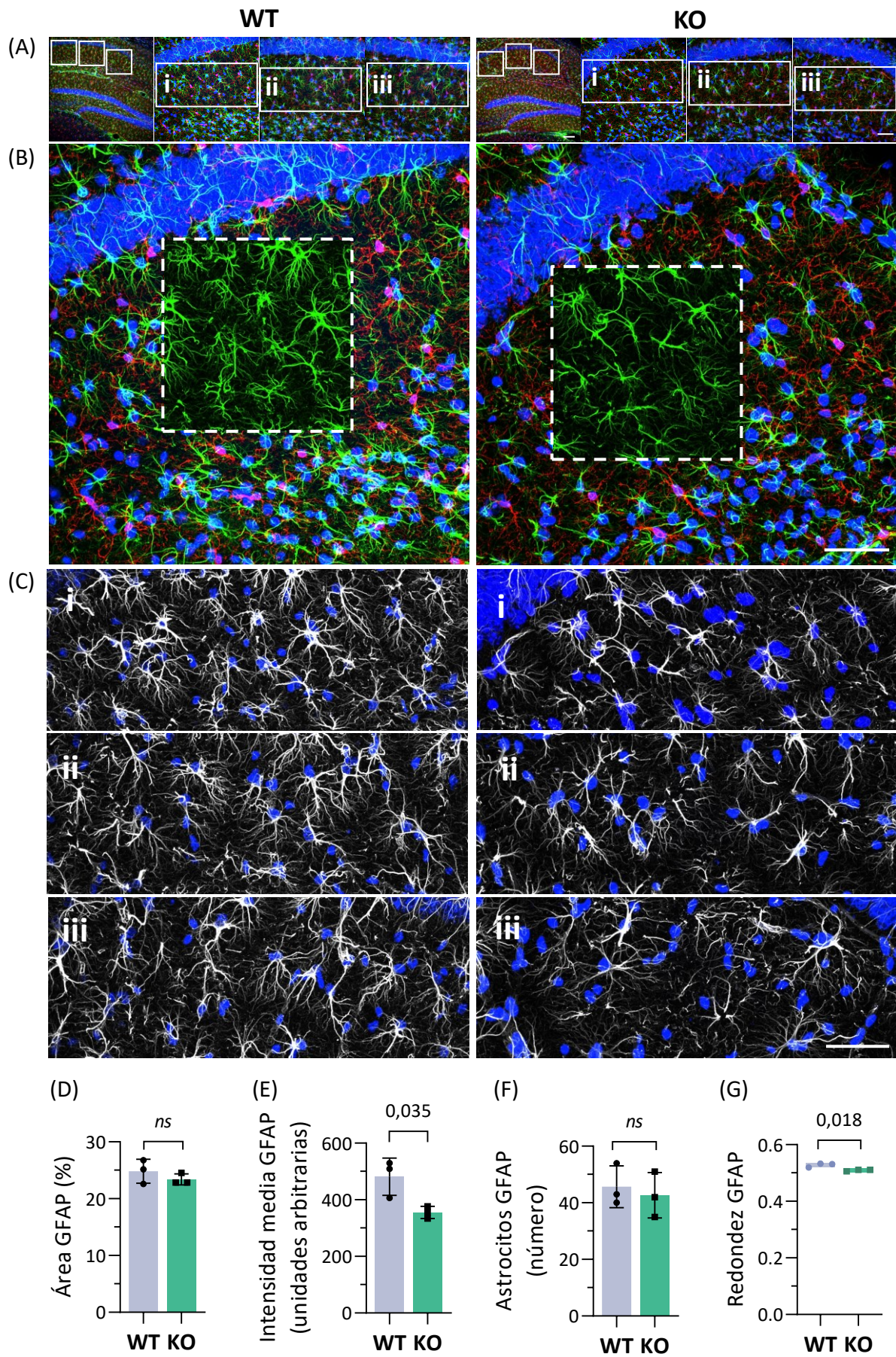


[Pie de figura en la siguiente página]

Figura 46. Caracterización de la estructura hipocampal mediante inmunodetección con MAP2 y DAPI. Imágenes tomadas de cortes sagitales de cerebros de animales WT y PFKFB3 KO (KO). Se muestran los núcleos (DAPI, azul) de los hipocampos de los tres animales empleados por condición (A). Se muestra la ampliación de una zona representativa de la región CA1 hipocampal (cuadro blanco) del marcaje nuclear con DAPI y la detección inmunohistoquímica de MAP2 (verde), destacándose una zona (cuadro discontinuo) para visualizar mejor la estructura neuronal (B). Los histogramas muestran las cuantificaciones del espesor de las capas CA1 (C), el área de ocupación neuronal MAP2 (D) y la abundancia de MAP2 (E). (n = 3); t de student; ns = no significativo. Barra escala A: 200 μm . Barra escala B: 50 μm .

En segundo lugar, se realizó una inmunohistoquímica contra las proteínas GFAP (verde) e IBA1 (rojo) para ver el estado en el hipocampo de los astrocitos y microglía, respectivamente. Se observa una imagen representativa del hipocampo de cada condición, donde se seleccionaron y ampliaron 3 áreas de la región CA1 (Figura 47A). En la Figura 47B se muestra una de estas ampliaciones a mayor tamaño, destacando en una zona (cuadro discontinuo) exclusivamente el canal del GFAP. En la Figura 47C se puede ver a más aumento parte del *estrato radiatum* de cada una de las 3 regiones de la CA1 ampliadas, con el DAPI en azul y la señal GFAP en blanco para una mejor apreciación de la morfología astrocítica. No se encontraron diferencias en el área ocupada por GFAP (Figura 47A) ni en el número de astrocitos (Figura 47F), por lo que la cantidad y tamaño de estas células parece mantenerse a pesar de la ausencia de PFKFB3 en astrocitos.

Sin embargo, sí se aprecia una disminución de la intensidad media de fluorescencia de GFAP (Figura 47E), lo que apuntaría a una menor expresión de GFAP en ausencia de PFKFB3. Además, se analizó un parámetro conocido como redondez (*Roundness*), que puede utilizarse para describir la morfología astrocítica. Cuando nos referimos a un astrocito "más circular", generalmente estamos hablando de un astrocito con un soma más prominente y con menos ramificaciones o más cortas. Se aprecia una reducción leve pero estadísticamente significativa de esta circularidad en animales PFKFB3 KO con respecto a los WT, indicando una diferencia morfológica de los astrocitos entre ambas condiciones (Figura 47G). Tanto la bajada de fluorescencia media de GFAP como la disminución de la redondez podrían estar asociado a una menor *reactividad* astrocítica entendida como aumento de los niveles de GFAP que se produce con la edad (Wilhelmsson *et al.*, 2006; Escartin *et al.*, 2021) y cuya relación con la glucólisis y la PFKFB3 ya ha sido estudiada (Fu *et al.*, 2015; Xiong, Tang y Yang, 2022). Aunque los cambios morfológicos o funcionales son la principal respuesta de los astrocitos a las lesiones cerebrales, también es común un cambio en el metabolismo energético para satisfacer las demandas, dado que la activación de astrocitos requiere una mayor síntesis y tráfico de proteínas (Xiong, Tang y Yang, 2022).



[Pie de figura en la siguiente página]

Figura 47. Caracterización de los astrocitos hipocampales mediante inmunodetección con GFAP. Imágenes tomadas de cortes sagitales de cerebros de animales WT y PFKFB3 KO (KO). Para cada condición se muestra una imagen representativa de la región CA1 hipocampal de cada condición, con tres zonas del *estrato radiatum* ampliadas a continuación, que reflejan los núcleos (DAPI, azul) y la inmunodetección de GFAP (verde) e IBA1 (rojo) (**A**), y una imagen representativa más grande donde se destaca (cuadro discontinuo) el canal del GFAP (**B**). Debajo se amplía de nuevo una zona (i, ii, iii) con los canales para el DAPI (azul) y GFAP (blanco), para destacar la morfología astrocítica (**C**). Los gráficos muestran las cuantificaciones del área de ocupación de GFAP (**D**), la abundancia de GFAP (**E**), el número de astrocitos (**F**) y el grado de circularidad (*round*) astrocítica (**G**). (n = 3); t de student; p-valor ≤ 0,1 numérico; ns = no significativo. Barra escala A: 200 μm. Barra escala B y C: 50 μm.

Finalmente, en la **Figura 48** se puede observar la inmunodetección de IBA1 (rojo) para evaluar el estado de las células microgliales. Se muestra una imagen representativa de la región hipocampal de cada condición (**Figura 48A**). En la ampliación de la zona del *estrato radiatum* cercana a la CA1 se muestra con más detalle la microglía tras establecer el umbral de detección de marcaje (*Threshold*) [ver apartado 18.3 de *Materiales y Métodos*] (**Figura 48B**). Se cuantificó el área de ocupación, la intensidad media de fluorescencia y el número de microglía IBA1 positiva (**Figura 48C-E**), sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas.

Análogamente al GFAP, se analizó la morfología celular con el parámetro solidez (*solidity*) a partir de esas imágenes procesadas (**Figura 48F**). La microglía activa se caracteriza por una estructura con menos prolongaciones y una forma más compacta y centrada en el soma, adoptando una morfología más "sólida". En contraste, en su estado inactivo, presenta una configuración más ramificada con contornos irregulares. Se observa un incremento leve, aunque no significativo, en los animales PFKFB3 KO en comparación con WT. La confirmación de una mayor solidez en los animales sin PFKFB3 astrocítica sería un indicativo de una mayor respuesta defensiva de este tipo celular. Sin embargo, se trata de un análisis preliminar, siendo mandatorio profundizar más en el estudio de su morfología.

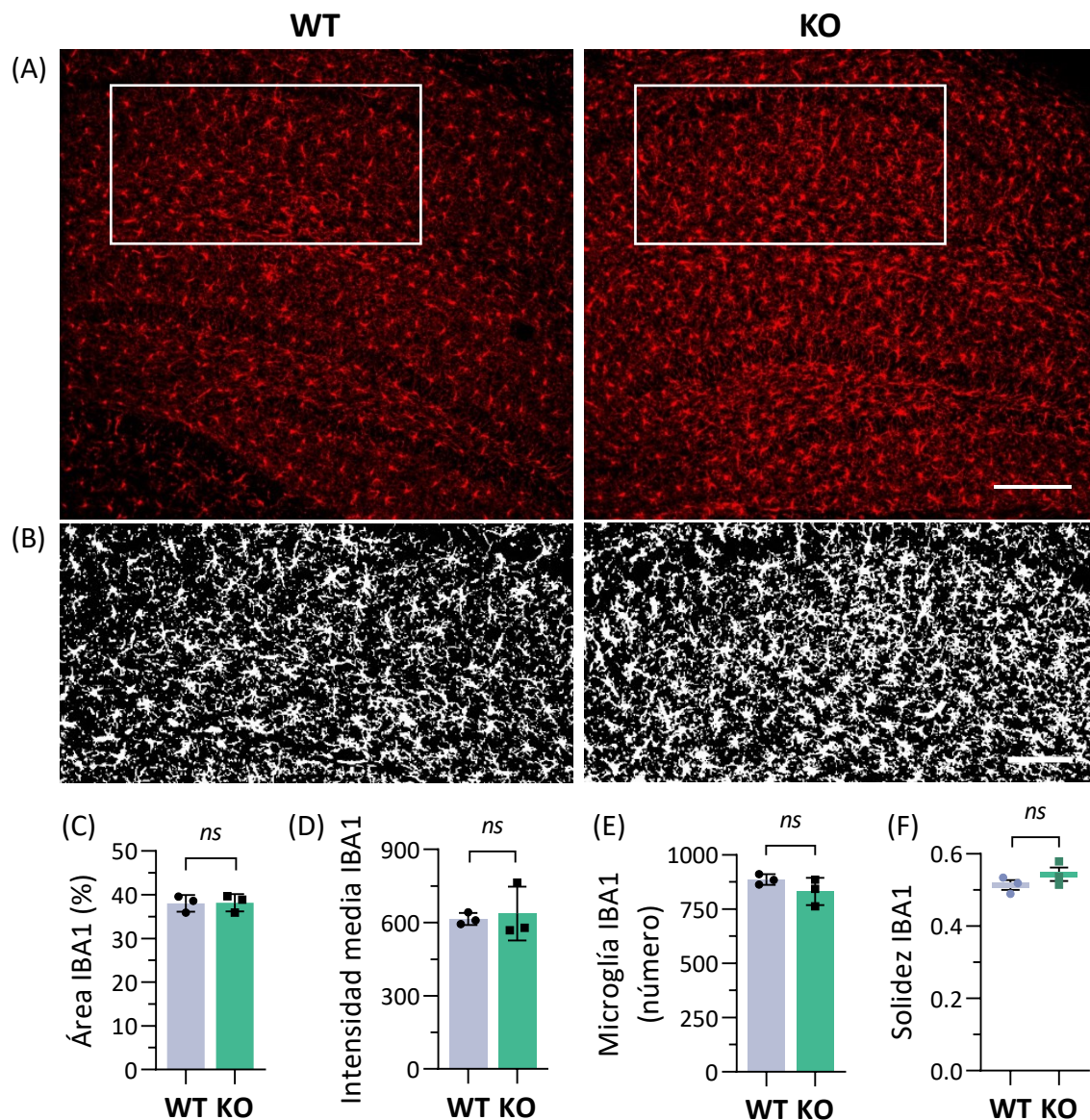


Figura 48. Caracterización de la microglía hipocampal mediante inmunodetección con IBA1. Imágenes tomadas de cortes sagitales de cerebros de animales WT y PFKFB3 KO (KO). Se muestra una imagen representativa de la región CA1 hipocampal de cada condición de la inmunodetección de IBA1 (rojo) (A). Se muestra una ampliación de una zona del *estrato radiatum* donde se muestra la inmunodetección de IBA1 (en blanco) para destacar la morfología microglial (B). Los histogramas muestran las cuantificaciones del área de ocupación de IBA1 (C), la abundancia de IBA1 (D), el número de células microgliales (E) y el grado de solidez (F). (n = 3); t de student; ns = no significativo. Barra escala A: 200 μ m. Barra escala B: 100 μ m

El análisis inmunohistoquímico del hipocampo ha revelado algunas diferencias entre los animales WT y PFKFB3 KO, especialmente en astrocitos. Las diferencias sutiles apreciadas en la morfología neuronal entre los genotipos pueden tener implicaciones funcionales relevantes que aún necesitan explorarse en profundidad. Este estudio destaca la importancia de la inmunohistoquímica para discernir las diferencias estructurales y morfológicas en las células del sistema nervioso, subrayando la necesidad de un análisis más exhaustivo y una metodología más específica para capturar la complejidad morfológica de estas células.

VIII. La eliminación de PFKFB3 en astrocitos tiene un efecto diferencial en el comportamiento de ratones hembra jóvenes en comparación con machos

A la vista de los resultados obtenidos para el grupo de animales macho jóvenes y para descartar la existencia de un posible dimorfismo sexual en el papel de la PFKFB3 astrocítica se decidió realizar, en paralelo, las pruebas conductuales con hembras de la misma edad, tanto en el momento de inoculación viral como en el momento de la realización de las pruebas.

En primer lugar, se evaluaron los diferentes tipos de memoria mediante las tres pruebas anteriormente mostradas (**Figura 49**).

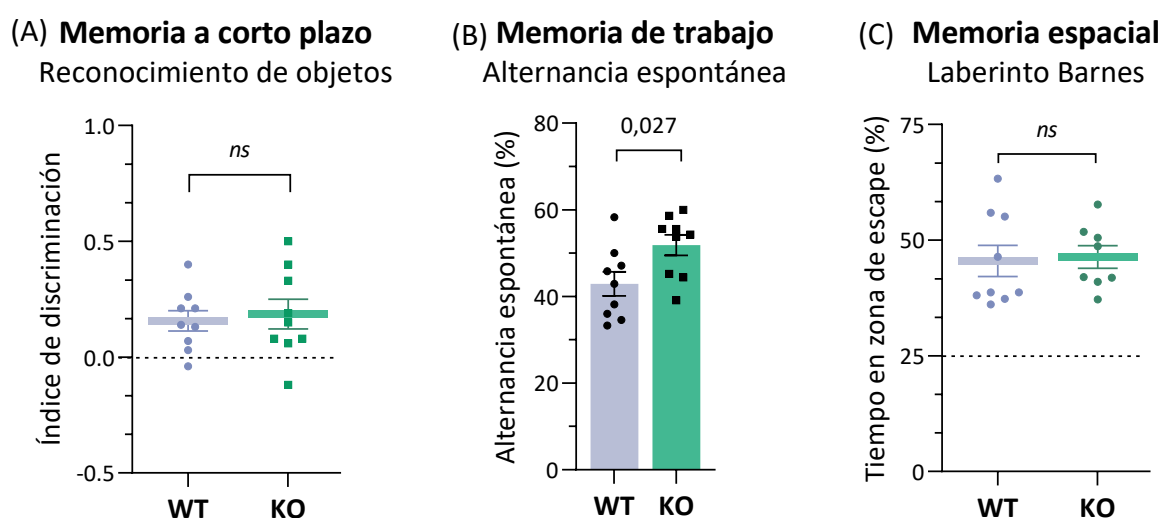
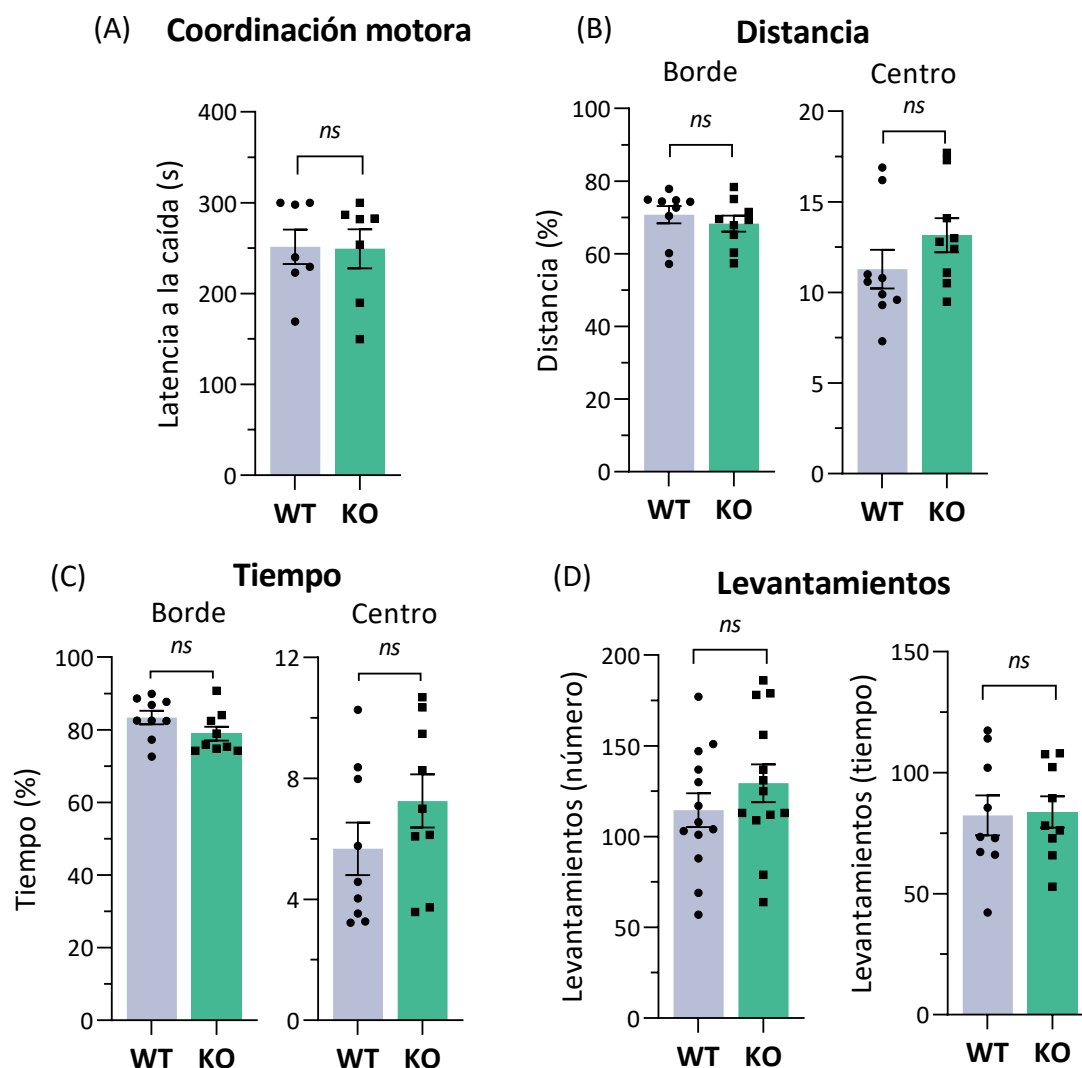


Figura 49. Evaluación de la memoria a corto plazo, memoria de trabajo y memoria espacial en hembras jóvenes WT y PFKFB3 KO. Se analizó la memoria a corto plazo en la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (A), la memoria de trabajo en el laberinto en Y (B) y la memoria espacial en el laberinto Barnes (C). Solo se encontraron diferencias significativas en el laberinto en Y, observándose una mejora de la memoria de trabajo en los animales PFKFB3 KO. Media \pm S.E.M. (n=8-9); t de Student de dos colas; p-valor \leq 0,1 numérico; ns = no significativo.

Una vez analizadas las pruebas cognitivas de memoria, solo se observaron diferencias significativas en la memoria de trabajo, donde las hembras PFKFB3 KO presentan un mayor número de alternancias espontáneas en comparación con las hembras WT (**Figura 49B**). Por tanto, se puede concluir que existe una afectación diferencial de la eliminación de la PFKFB3 astrocítica en hembras jóvenes, con respecto a machos jóvenes. Mientras que los machos PFKFB3 KO presentan un déficit de memoria a corto plazo y de memoria de tipo espacial, las hembras carentes de PFKFB3 en los astrocitos no presentaron ninguna alteración en comparación con las WT. En relación con la memoria de trabajo, no se observa ninguna diferencia entre ambos genotipos de machos; en cambio, en las hembras PFKFB3 KO existe una mejora significativa del porcentaje de alternancias espontáneas en el laberinto en Y.

Posteriormente, se evaluó la coordinación motora mediante Rotarod y también se analizó la prueba de campo abierto u *Openfield* (Figura 50).



Evaluando la latencia a la caída mediante Rotarod, no se aprecian diferencias significativas entre las hembras WT y PFKFB3 KO, lo que indica ausencia de alteraciones de la coordinación motora. Con respecto a la prueba de campo abierto, tampoco aparecen diferencias significativas entre ambos genotipos. Sin embargo, las hembras PFKFB3 KO presentan cierta tendencia hacia el aumento en la distancia recorrida en la zona central y en el número de levantamientos, efectos con tendencia opuesta a la observada en machos.

A continuación, se realizó la prueba de *Hole board* (Figura 51A) y la de *Black & White* (Figura 51B) con objeto de evaluar los fenotipos exploratorio y de miedo/ansiedad en las hembras.

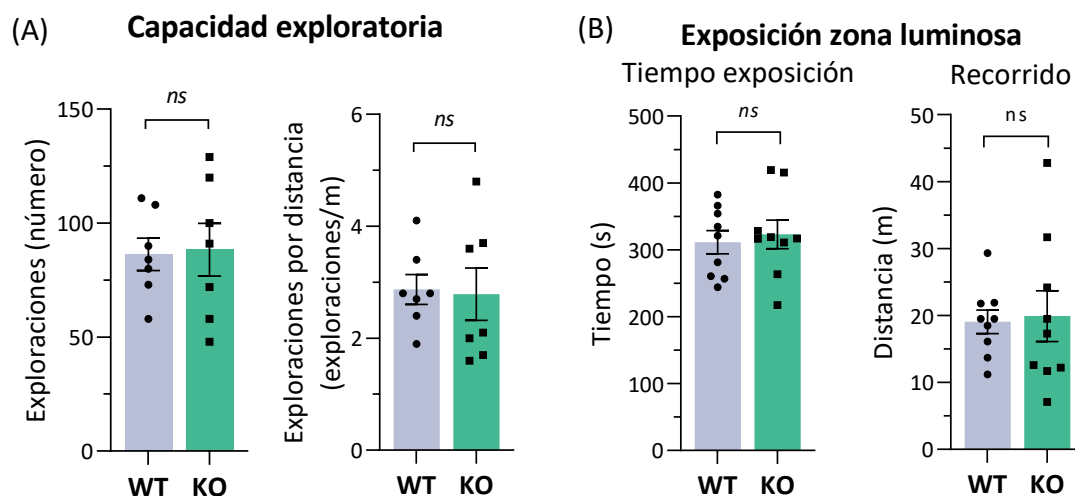


Figura 51. Evaluación del fenotipo exploratorio y de miedo/ansiedad de hembras jóvenes WT y PFKFB3 KO. Se registra la capacidad exploratoria en forma de exploraciones, tanto totales como normalizadas por la distancia recorrida en el *Hole board* (A). Se muestran los porcentajes de tiempo transcurrido y distancia recorrida en la zona luminosa de la Caja Blanca/Negra (B). No se observa ninguna diferencia significativa entre genotipos. Media \pm S.E.M. (n=7-9); t de Student; ns = no significativo.

Como puede observarse, no se encuentran diferencias significativas entre genotipos en ninguno de los parámetros analizados, lo que indica que las hembras que carecen de PFKFB3 en los astrocitos no tienen afectada la capacidad exploratoria ni sufren alteraciones relacionadas con emociones de miedo o ansiedad. Por tanto, se puede concluir que la eliminación específica de la PFKFB3 en astrocitos causa alteraciones diferenciales en machos y en hembras en el comportamiento exploratorio y/o de miedo y ansiedad.

A la luz de todos estos resultados, es evidente que la eliminación de PFKFB3 específicamente en astrocitos tiene un impacto diferencial dependiente del sexo de los animales. Mientras que en los machos PFKFB3 KO se aprecia una notable afectación en la memoria, y cambios más moderados en los comportamientos asociados al miedo, ansiedad y exploración, en las hembras PFKFB3 KO no se demostró la misma susceptibilidad ante estas alteraciones. Este hallazgo destaca la importancia de las diferencias sexuales en la investigación, sugiriendo variaciones en la función de la PFKFB3 de astrocitos según el sexo.

Estas observaciones motivan la realización, en el futuro, de estudios más detallados para profundizar en las implicaciones moleculares de la PFKFB3 en los astrocitos en edades tempranas, donde la glucólisis astrocítica parece tener un papel más relevante en el mantenimiento de las funciones cerebrales superiores, y sexualmente diferencial.

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo es determinar la importancia de la PFKFB3 astrocítica en el cerebro. Los trabajos previos del laboratorio confirman que las neuronas y los astrocitos utilizan de una forma diferencial la glucosa captada. Mientras que las primeras la derivan principalmente hacia la PPP, en los segundos se dirige mayoritariamente hacia la glucólisis. Se demostró que esta diferencia radicaba en la presencia de altos niveles del metabolito F26BP en los astrocitos en comparación con las neuronas, y que la enzima responsable de estos niveles era la PFKFB3 (Almeida, Moncada y Bolaños, 2004). Los niveles de expresión del mRNA de la *Pfkfb3* son muy similares entre ambos tipos celulares, pero la alta actividad del complejo APC/C-Cdh1 en neuronas mantienen unos niveles mínimos de la proteína en condiciones normales (Herrero-Mendez *et al.*, 2009). En neuronas, una alteración en el control de la abundancia de PFKFB3 puede provocar un aumento del estrés oxidativo y neurodegeneración (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012). Por tanto, el mantenimiento de unos niveles bajos basales de PFKFB3 en neuronas parece clave para conseguir la funcionalidad celular. Las consecuencias finales de este desajuste en el contexto más complejo del cerebro son parte de otra de las líneas de investigación de nuestro laboratorio (Jiménez-Blasco *et al.*, 2023). En astrocitos en cultivo primario, la reducción de los niveles de PFKFB3 mediante RNA de interferencia conlleva una disminución en el flujo glucolítico (Almeida, Moncada, y Bolaños 2004). No obstante, hasta el presente trabajo no se había investigado, de manera exhaustiva, los cambios metabólicos asociados a la eliminación genética de la PFKFB3 en astrocitos, tanto los ocurridos dentro de la propia célula, así como su posible influencia en la funcionalidad de las neuronas adyacentes en el animal adulto.

En la ruta glucolítica, una enzima reguladora clave es la PFK1, cuyo efector alostérico positivo más potente es F26BP (Sola-Penna *et al.*, 2010). La PFKFB3 surge como una enzima clave en la activación de la PFK1, al tratarse de una enzima bifuncional con una actividad quinasa muy superior a la fosfatasa, produciendo grandes cantidades de F26BP (Sakai *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2006). Por este motivo, se decidió diseñar un modelo animal que nos permitiese reducir los niveles de PFKFB3, específicamente en astrocitos.

Consecuencias metabólicas de la eliminación de PFKFB3 en astrocitos

En primer lugar, se confirmó el descenso de la abundancia de la proteína en cultivo primario de astrocitos (**Figuras 2-3**), sin alterar la expresión proteica compensatoria de las otras

isoformas conocidas (**Figura 5**). En extractos hipocampales de animales inoculados por vía retroorbital, con virus adenoasociados que expresaban la recombinasa CRE bajo el promotor astrocítico GFAP, se comprobó también la reducción de los niveles de la proteína PFKFB3 (**Figura 25**). Para validar funcionalmente el modelo, se determinaron los niveles de F26BP en cultivo, y se observó una disminución del 30 % en los astrocitos carentes de la PFKFB3, un porcentaje muy inferior al observado en el descenso de los niveles proteicos de PFKFB3. Esto sugiere que una proporción notable de la F26BP no se origina a partir de la actividad de la enzima PFKFB3. Sin embargo, debido a su potente efecto alostérico, esta reducción fue lo suficientemente importante como para provocar una disminución considerable de la actividad de la PFK1 que condujo al descenso de la ruta glucolítica en aproximadamente un 50% en cultivo (**Figura 6A**). Esto demuestra la importancia de la PFKFB3 para mantener unos niveles de glucolisis óptimos en condiciones de reposo.

Además, su papel se torna también relevante en una situación de depleción energética como la provocada por la adición de KCN, donde se observó que el incremento neto de la ruta glucolítica es sustancialmente menor en la condición PFKFB3 KO con respecto a la WT (**Figura 6B**). Investigaciones anteriores del laboratorio mostraron que, en cultivo primario de astrocitos de rata, tanto el óxido nítrico como el KCN eran capaces de activar la PFKFB3 a través de AMPK, favoreciendo la glucolisis (Almeida, Moncada y Bolaños, 2004). Estos resultados entran en controversia con los obtenidos en este trabajo, donde no se encontró esa activación de la PFKFB3 inducida por KCN, que debería reflejarse en un aumento de los niveles de F26BP (**Figura 7**). Por tanto, es presumible que los efectos glucolíticos de la acción del KCN se ejerzan a través de otras enzimas implicadas en la ruta, particularmente la PFK1, la cual sabemos que también se puede activar ante una depleción energética mediante la acción alostérica de AMP, o a través de otros metabolitos como el lactato (Costa Leite *et al.*, 2007; Marin-Hernandez *et al.*, 2009; Sola-Penna *et al.*, 2010). Teniendo en consideración que los ensayos se han llevado a cabo en una especie diferente, es plausible que, bajo nuestras condiciones experimentales, los niveles normales de F26BP estén bajo un control más riguroso o que la PFKFB3 ya esté operando a su máxima capacidad funcional. De este modo, el margen de activación de la PFK1 depende determinantemente de los niveles de F26BP, reducidos en la condición PFKFB3 KO. Sin embargo, para establecer una conclusión firme es necesario un estudio más exhaustivo de la actividad de ambas enzimas, esto es PFK1 y PFKFB3. Independientemente del mecanismo de acción del KCN, estos resultados confirman que la

PFKFB3 es esencial para el aumento de la actividad de la PFK1, tanto en condiciones de reposo como durante un estrés bioenergético.

Se comprobó también que se producía un descenso de la glucólisis en secciones de tejido cerebral, posiblemente causado por el descenso de la ruta en astrocitos debido a la ausencia de la PFKFB3 (**Figura 26**). Paralelamente, en el estudio metabolómico se detectó una disminución de piruvato en los animales PFKFB3 KO en comparación con los WT (**Figura 42**), resultados compatibles con estas observaciones.

Ante un menor uso de la glucosa a través de la vía principal de consumo en astrocitos, como es la glucólisis, se decidió determinar la existencia de una derivación de esta glucosa hacia otras rutas que se encuentran normalmente más reprimidas en estas células, como la PPP (Herrero-Mendez *et al.*, 2009). Sin embargo, se comprobó la ausencia de un incremento en esta vía (**Figura 8A**). Posteriormente, se analizó si la parte de la glucosa que no se consume mediante la glucólisis ni se canaliza hacia la PPP era redireccionada hacia la formación de glucógeno. Se observó una acumulación basal del contenido de glucógeno, cuya degradación, por depleción extracelular de glucosa, estaba limitada en los astrocitos PFKFB3 KO (**Figura 9A**). Se comprobó que este bloqueo en la degradación no parecía estar provocado por defectos intrínsecos de la maquinaria de degradación del glucógeno, ya que las reservas se deplecionaban completamente tras la estimulación con KCN (**Figura 10**).

El glucógeno cerebral, aunque se encuentra en bajas concentraciones, es importante para la salud neuronal y cognitiva. A pesar de no actuar como una reserva energética tradicional, su presencia en astrocitos es crucial para mantener la función neuronal. Diversos neurotransmisores, incluido el glutamato, regulan su metabolismo, adaptándose a demandas metabólicas cambiantes (Magistretti *et al.*, 1994; Sorg *et al.*, 1995; Sickmann *et al.*, 2009). La relación dinámica entre glucogenolisis y glucólisis, referida como *derivación del glucógeno*, garantiza un flujo energético constante en respuesta a estímulos (Walls *et al.*, 2009; Jakobsen *et al.*, 2017). Se ha demostrado que el glucógeno astrocítico y el lactato derivado son cruciales para la consolidación de la memoria a largo plazo (Suzuki *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016). En contraposición, las anomalías en la gestión del glucógeno, como ocurre en la enfermedad de Lafora, resultan en la aparición de trastornos cognitivos y neurológicos (Vilchez *et al.*, 2007; Rubio-Villena *et al.*, 2018; Duran *et al.*, 2021). No obstante, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glucógeno en cerebro entre animales WT y

PFKFB3 KO, aunque sí una tendencia al aumento en los últimos (**Figura 37**). Es probable que exista una regulación más rigurosa de las reservas de glucógeno o de la absorción de glucosa *in vivo*. Además, la dinámica intrínseca de la neurotransmisión, que cabría ser diferente ante la ausencia de la PFKFB3, podría alterar la formación y degradación del glucógeno, impactando en sus niveles de manera distinta a las condiciones de cultivo. Dada la importancia del glucógeno a nivel cerebral, sería interesante profundizar en el estudio de su posible papel diferencial determinado por la ausencia de la PFKFB3 en astrocitos.

Al evaluar la degradación del glucógeno tras un agotamiento de glucosa, se consideró que la ausencia total de glucosa podría influir en el metabolismo astrocítico a través de la activación de la autofagia, posiblemente de manera distinta en ausencia PFKFB3, planteándose la posibilidad de una alteración a nivel de esta vía (Karabiyik *et al.*, 2021). Se comprobó que existe un déficit del flujo autofágico en los astrocitos carentes de PFKFB3 (**Figura 11**) que podría ser la causa del bloqueo observado en la glucogenolisis en ausencia de glucosa (**Figura 9A**). Se ha visto que la autofagia es esencial en la regulación celular y en las respuestas al estrés en el cerebro (Sung y Jimenez-Sanchez, 2020) y su disfunción puede afectar al aprendizaje y a la memoria (Glatigny *et al.*, 2019). Además, hay estudios en contextos oncológicos que asocian la PFKFB3 con la autofagia, aunque el modo de interacción todavía está en debate. Mientras que algunos estudios indican que al inhibir la PFKFB3 se reduce la autofagia y se potencia la citotoxicidad (La Belle Flynn *et al.*, 2019), otros hallazgos sugieren que la inhibición de la PFKFB3 induce la autofagia, con diferentes consecuencias según el escenario (Klarer *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2021). La autofagia astrocítica modula la dinámica mitocondrial, siendo crucial en la fagocitosis de mitocondrias dañadas, evitando el aumento de ROS (Motori *et al.*, 2013). La modulación astrocítica de la autofagia protege las neuronas frente a daños, subrayando la relevancia de los astrocitos en la homeostasis cerebral (Davis *et al.*, 2014; Ortiz-Rodriguez y Arevalo, 2020). Además, un déficit autofágico, como proceso importante de reciclaje, podría estar afectando a los niveles de aminoácidos, nucleósidos y lípidos, participando en el desequilibrio homeostático de estos observado en el análisis metabolómico (**Figura 40**) (Martínez-García *et al.*, 2021). A pesar de que en este trabajo no se ha estudiado más en detalle este complejo proceso, se debe tener en cuenta que un déficit autofágico puede ser causa de alteraciones funcionales superiores en el animal.

No obstante, el aumento de los niveles de glucógeno en astrocitos PFKFB3 KO *in vitro* no explicaría el destino del exceso de glucosa. En primer lugar, porque las reservas de glucógeno

en astrocitos son mínimas en términos de abundancia, con respecto a la glucosa que se consume por la ruta glucolítica. En segundo lugar, porque ese aumento de glucógeno no responde al concomitante uso de la glucosa procedente del mismo tras su degradación. Por consiguiente, y en línea con las expectativas confirmadas por el estudio, los astrocitos que carecen de la PFKFB3 mostraron una reducción en el consumo de glucosa, que quedó claramente reflejado en el experimento de captación de 2DG (**Figura 13**). Una menor captación de glucosa por parte de los astrocitos puede tener consecuencias funcionales significativas, como la posibilidad de dejar más glucosa extracelular disponible para el resto de las células, como las neuronas. Se ha sugerido que la glucosa se puede difundir desde las células endoteliales hacia células cerebrales más distantes, evitando el paso mayoritario a través de los astrocitos y facilitando la rápida absorción mediada por GLUT3 en las neuronas (Simpson, Carruthers y Vannucci, 2007). Esta idea está apoyada por la observación del incremento drástico en el consumo de glucosa por las neuronas tras la estimulación, adoptando un perfil altamente glucolítico (Díaz-García et al. 2017). Sorprendentemente, la ablación de GLUT1 en astrocitos resultó en una mejor homeostasis de la glucosa y una mayor activación neuronal en respuesta a tareas cognitivas, lo que sugiere que una "escasez de glucosa astrocítica" puede tener efectos beneficiosos en la función cerebral (Ardanaz *et al.*, 2022).

Paralelo a un menor uso de glucosa y disminución de la ruta glucolítica, se demostró una reducción de aproximadamente un 40% en la producción de lactato extracelular en los astrocitos PFKFB3 KO (**Figura 14**). Numerosos estudios señalan al lactato como un regulador esencial de la dinámica energética del cerebro, especialmente en la interacción bioenergética entre astrocitos y neuronas. La transferencia de lactato se torna crucial, especialmente durante periodos de alta demanda energética, como la formación y consolidación de la memoria (Suzuki *et al.*, 2011; Descalzi *et al.*, 2019). En situaciones de estrés, la reducción del transporte de glucosa y lactato en astrocitos afecta la potenciación a largo plazo, pero puede restaurarse con el suministro de lactato (Murphy-Royal *et al.*, 2020). Además, se ha vinculado la disminución de lactato con el desarrollo de comportamientos depresivos, sugiriendo su influencia en la excitabilidad neuronal (Yao *et al.*, 2023).

En el estudio metabólico no se encontraron diferencias en lactato, posiblemente por tratarse de un metabolito muy lábil, pero sí se observó una disminución de la valina lactilada (**Figura 42**). Aunque los aminoácidos lactilados no parecen tener una función establecida, pueden ser un reflejo de cambios en los niveles de lactato (Jansen *et al.*, 2015). Con respecto

a este hecho, es importante señalar que, aunque el lactato ha sido tradicionalmente visto como un simple metabolito, las investigaciones recientes sugieren que puede tener roles más complejos, interviniendo en la regulación epigenética. El lactato influye en la expresión genética relacionada con la adaptación metabólica, control del ciclo y crecimiento celulares, por lo que una disminución de este podría afectar directamente a estos procesos (San-Millán *et al.*, 2020). Descubrimientos recientes han revelado que el lactato está implicado en mecanismos epigenéticos como la lactilación y acetilación; además de servir directamente como donador de grupos lactilo, se ha observado que su metabolización está asociada a la transformación en grupos acetilo que intervienen en los procesos de acetilación de histonas (D. Zhang *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2023). La vinculación entre el metabolismo y la regulación génica emerge como un interesante campo que apenas se comienza a descifrar, con potencial relevancia en patologías neurológicas (Liu *et al.*, 2022).

El otro destino principal del piruvato, aunque más secundario a la producción de lactato en los astrocitos, es su entrada en la mitocondria (Pierre y Pellerin, 2005; Halim *et al.*, 2010). Curiosamente, se observó que la ausencia de PFKFB3 en astrocitos cursaba con una mayor conversión de piruvato a acetil-CoA por el complejo de la PDH (**Figura 15**), acompañado de una mayor entrada de ese acetil-CoA y descarboxilación en el ciclo de Krebs (**Figura 17**). Dado que la principal forma de regulación conocida del complejo de la PDH es la fosforilación, que lo inactiva, decidimos analizar esta modificación postraduccional mediante inmunodetección por *Western blot*. En los astrocitos, en comparación con neuronas, la PDH está más fosforilada, reduciendo su actividad y favoreciendo la producción de lactato (Halim *et al.*, 2010). Una disminución de los niveles de fosforilación podría conllevar a un aumento de la conversión de piruvato a acetil-CoA, pero en nuestras condiciones no se observaron cambios en la ratio de PDH fosforilada con respecto a la total en los astrocitos que carecen de PFKFB3 frente a los WT (**Figura 16**), por lo que la regulación debe ocurrir a otro nivel. Es posible que un aumento del uso del acetil-CoA por el TCA debido a una hiperactivación de este, provoque la reducción de la concentración de piruvato citosólico, favoreciendo su entrada a la mitocondria y posterior conversión por la PDH. Esta idea también estaría apoyada por la disminución de piruvato encontrada en el análisis metabólico *ex vivo*, como se comentó anteriormente (**Figura 42**). Se detectó también un incremento de glicerato en los cerebros de los animales PFKFB3 KO (**Figura 42**). Es posible que, ante una disminución de la glucólisis, se produzca un mecanismo compensatorio para aumentar el glicerato y convertirlo en 3-fosfoglicerato, especialmente si

hay una demanda celular de este intermediario para otras rutas metabólicas, como puede ser la síntesis de serina, o la simple producción de piruvato a partir de pasos intermedios de la vía glucolítica (Park *et al.*, 2017). En cualquier caso, el posible aporte externo de metabolitos a la glucólisis, distintos a la glucosa, no parece ser capaz de compensar la glucólisis como para alcanzar los mismos niveles de piruvato y lactato en los animales PFKFB3 KO con respecto a los controles WT.

Además del piruvato, los astrocitos obtienen acetil-CoA de los ácidos grasos mediante la β -oxidación. Un estudio reciente en glía de *Drosophila* mostró que, con un deterioro glucolítico, la oxidación de ácidos grasos se tornaba imprescindible para la correcta viabilidad del organismo (McMullen *et al.*, 2023). Esto sugiere que los astrocitos que carecen de PFKFB3 podrían intensificar este proceso catabólico de oxidación de ácidos grasos, aumentando la entrada de acetil-CoA en la mitocondria y respaldando las demandas del ciclo de TCA. Sin embargo, al determinar el flujo de β -oxidación, se observó que no estaba aumentando en los astrocitos PFKFB3 KO con respecto a los WT (**Figura 18**). Estos resultados contrastan con los hallazgos en mosca. Se deben considerar las diferencias metodológicas entre ambas investigaciones. En los estudios con *Drosophila*, se utilizó un KO de la piruvato quinasa, una enzima glucolítica esencial, lo que podría afectar notablemente al metabolismo general, incluyendo la función mitocondrial. Por el contrario, en nuestro modelo, se permite una glucólisis basal que mantiene la capacidad de ser regulada (**Figura 6**). Además, las diferencias entre especies y la relevancia de los ácidos grasos en *Drosophila*, en relación a la movilización de lípidos desde la periferia para mantener la homeostasis cerebral, deben ser consideradas (McMullen *et al.*, 2023). Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la propuesta de que la principal función de la β -oxidación en astrocitos podría no ser la generación de energía. De hecho, un estudio reciente de nuestro laboratorio, ya comentado anteriormente, demostró que el metabolismo mitocondrial de los ácidos grasos en astrocitos estaría más dirigido al mantenimiento del estado redox celular, contribuyendo a una producción elevada de ROS, fundamentales para la señalización celular (Morant-Ferrando *et al.*, 2023). A pesar de no encontrar diferencias en la ruta β -oxidativa, sí se observó un aumento de la descarboxilación del palmitato (**Figura 19A**). Esta lectura se hace a nivel de la producción del CO₂ en el TCA a partir del acetil-CoA derivado del palmitato, apoyando la idea de una remodelación metabólica mitocondrial dirigida, al menos en parte, hacia una hiperactivación del TCA.

En el estudio metabólico se encontró un aumento significativo del intermediario del TCA α -cetoglutarato (**Figura 42**), que es compatible con un incremento del ciclo por encima de la capacidad de utilización de este metabolito. El hallazgo de un TCA más activo ofrece una nueva perspectiva sobre su potencial impacto en la función y salud neuronal. Se estima que entre el 30% y 50% del piruvato mitocondrial en astrocitos se dirige hacia procesos anapleróticos, por lo que TCA acelerado no solo incrementaría la producción de energía, sino que también podría tener implicaciones en el catabolismo subsecuente (Weber y Barros, 2015). Las neuronas, que requieren la colaboración de los astrocitos para adquirir metabolitos cruciales debido a su deficiencia en algunas enzimas anapleróticas, podrían experimentar alteraciones en sus funciones vitales, abarcando aspectos fundamentales como la neurotransmisión (Öz *et al.*, 2004). En particular, la acumulación de α -cetoglutarato invita a una discusión más profunda sobre su rol en la dinámica del TCA. Un aumento en la actividad del TCA podría promover la activación de las vías de reabastecimiento de este intermediario, ya que el glutamato es un precursor anaplerótico para la síntesis de α -cetoglutarato (Lovatt *et al.*, 2007). Este fenómeno es vital para la homeostasis neuronal y podría reflejar una adaptación metabólica del cerebro para satisfacer demandas energéticas elevadas, manteniendo así la funcionalidad del ciclo completo. La reversibilidad de la reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa permite que, en condiciones de hiperactivación del TCA en los astrocitos, se pueda incrementar aún más la disponibilidad de glutamato, precursor de glutamina, para las neuronas. Este mecanismo afecta directamente la homeostasis del glutamato, un neurotransmisor crítico para la función cerebral. Además, el TCA astrocítico puede suministrar directamente precursores para la síntesis de otros neurotransmisores esenciales como el GABA y la acetilcolina, ejerciendo un impacto importante en la neurotransmisión y en la funcionalidad neuronal en general.

Otros intermediarios como el citrato, producido principalmente por los astrocitos, son necesarios para la producción de colesterol, lactato, así como otros metabolitos que están directamente implicados en el control de la excitabilidad neuronal (Sonnewald *et al.*, 1991; Westergaard *et al.*, 2017; Natarajaseenivasan *et al.*, 2022). Sin embargo, un exceso de neurotransmisores puede desencadenar hiperexcitabilidad neuronal y desequilibrios sinápticos, y excesos en la producción de lípidos como el colesterol podrían comprometer la fluidez y función de las membranas neuronales. Por otro lado, las intervenciones metabólicas que afectan al ciclo de Krebs, como la restricción calórica y la dieta cetogénica, han demostrado

extender la longevidad, pero una hiperactivación descontrolada podría contrarrestar estos beneficios (Borkum, 2023).

Con objeto de abordar las posibles causas de una activación del TCA, se evaluaron los niveles totales de NAD/NADH, pero no se observó una disminución significativa de los niveles de NADH ni un aumento de la ratio NAD/NADH que pudiera estar activando ciertas enzimas del ciclo de Krebs (**Figura 20**). Por tanto, es probable que un incremento en la regeneración de NADH debido a la mayor actividad del TCA, se equilibre con un aumento en su uso, a través, por ejemplo, del complejo I de la CTE. Este cambio en el flujo de electrones puede, a su vez, influir en la actividad de la propia CTE y en la fosforilación oxidativa y producción de ATP mitocondrial. Mediante la tecnología Seahorse se comprobó un aumento claro de la respiración mitocondrial máxima, que se refleja también en la mayor capacidad respiratoria de reserva (**Figura 21D-E**), lo cual podría conferir una ventaja adaptativa frente a determinados estímulos como la neurotransmisión o ante un estrés bioenergético.

Además, se observó una tendencia al incremento en la respiración basal (**Figura 21C**), compatible con el aumento en la tasa de producción mitocondrial de ATP (**Figura 22A**). Así, la ausencia de la PFKFB3, específicamente en astrocitos, conduce al aumento del consumo de oxígeno mitocondrial concomitante a un incremento de la producción de ATP por parte de este orgánulo. Además, se comprobó que los niveles de ATP intracelulares totales se mantenían invariables (**Figura 22B**), probablemente porque el ATP mitocondrial estaba compensando la disminución de producción de ATP glucolítico (**Figura 22A**). Por tanto, parece que los astrocitos PFKFB3 KO son capaces de compensar el déficit de ATP glucolítico solamente remodelando su mitocondria.

La mayor producción mitocondrial de ATP puede ser el reflejo de una determinada reorganización de la CTE. Así, la formación de SC es un proceso dinámico y que influye en la regulación del flujo de electrones para optimizar el uso de sustratos disponibles (Novack *et al.*, 2020). Un incremento en la formación de supercomplejos en los astrocitos podría resultar en un aumento de la transferencia de electrones y, por lo tanto, un consumo de oxígeno más elevado. Este aumento en la respiración podría satisfacer las altas demandas energéticas de las células y tejidos circundantes. De acuerdo a estas consideraciones, se comprobó que los astrocitos carentes de PFKFB3 presentaban una mayor proporción de complejos I y III ensamblados en SC (**Figura 23**). Este mayor ensamblaje permite incrementar la producción de

ATP a expensas de una reducción en la producción de ROS (Lopez-Fabuel *et al.*, 2016). De hecho, tras analizar la producción de H₂O₂ (**Figura 24A**) y de ROS mitocondriales (**Figura 24B**), se observa en ambos casos una reducción significativa en los astrocitos PFKFB3 KO con respecto a los WT.

Las neuronas, aunque poseen defensas antioxidantes limitadas, están protegidas contra el daño oxidativo mediante varios mecanismos. Además de sus propios mecanismos internos, estarían indirectamente protegidas por los astrocitos vecinos a través de su potente función antioxidante mediada por la vía de Nrf2 (Jiménez-Blasco *et al.*, 2015). Durante la neurotransmisión, los astrocitos activan genes antioxidantes, proporcionando precursores necesarios para la síntesis del glutatión neuronal. Por tanto, una reducción de las ROS en astrocitos podría conducir a alteraciones en la homeostasis redox y en la supervivencia neuronal, como ya se comprobó en trabajos previos del laboratorio (Vicente-Gutierrez *et al.*, 2019). Por este motivo, se quiso determinar la producción de H₂O₂ tanto en astrocitos como en neuronas procedentes de cerebros de ratones PFKFB3 KO, observándose una disminución significativa de este oxidante en los astrocitos, pero no en las neuronas de estos animales en comparación con los WT (**Figura 45**), corroborando los resultados *in vitro*. Si bien solamente se trata de una única aproximación, es posible que la bajada de estas ROS en astrocitos y la presumible reducción de su respuesta antioxidante no sea suficiente para provocar el incremento de las ROS en neuronas. Es necesario profundizar en el estudio del estado redox neuronal a través de otras aproximaciones.

A pesar de estos resultados *ex vivo*, el análisis metabolómico mostró una clara afectación del estado redox cerebral en los animales PFKFB3 KO. Se detectó un aumento del ácido ascórbico oxidado (dehidroascorbato), junto con la disminución del mismo en su forma reducida, así como una reducción del gulonato y del treonato, precursor y producto de degradación del ácido ascórbico, respectivamente (**Figura 44**). En ratones, el ácido ascórbico puede ser sintetizado a partir de glucosa y participa en la regeneración del GSH, por lo que las alteraciones encontradas en este metabolito se pueden asociar con procesos de estrés oxidativo (Rice, 2000). Se sabe que existe un mecanismo de transporte de ácido ascórbico entre astrocitos y neuronas, el cual desempeña un papel crucial en la protección antioxidante proporcionada por los astrocitos a las neuronas. Esta interacción podría verse comprometida en los animales con deficiencia de PFKFB3 (Allaman, Bélanger y Magistretti, 2011). Además, el ácido ascórbico es un cofactor clave en la producción de catecolaminas, que tienen roles

vitales en diversas funciones y respuestas al estrés (Acuña *et al.*, 2013). Como apoyo a estas observaciones, aparece también aumentada la cisteinil-glicina oxidada en los animales PFKFB3 KO (**Figura 44**), implicada en el metabolismo y regulación de los niveles del glutatión (Dringen, Gutterer y Hirrlinger, 2000). Además, se detectó una reducción de N-acetil-glutamina (**Figura 40**), que es compatible con un uso intensificado de glutamina para la síntesis de glutatión. En este análisis se encontró también una notable afectación del metabolismo de purinas y pirimidinas, particularmente un detrimento de sus niveles, en los cerebros de los ratones PFKFB3 KO (**Figura 43, 40**). La deficiencia observada en purinas y pirimidinas podría estar relacionada con la hiperactivación del TCA, lo que sugiere una posible redirección de carbonos para mantener el ciclo, en detrimento de la síntesis de bases nitrogenadas (Lane y Fan, 2015). Por otra parte, el estrés redox podría comprometer su capacidad para combatir el daño oxidativo, lo que puede alterar indirectamente a la síntesis de nucleótidos (Lane y Fan, 2015), o directamente al ADN, conllevando al daño genómico y a la afectación de la función celular (Cadet y Richard Wagner, 2013).

Afectación de la morfología y estructura neurales por la eliminación de la PFKFB3 astrocítica

En ratones PFKFB3 KO, a pesar de no observarse grandes cambios anatómicos cerebrales, sí se aprecian visualmente signos de alteraciones estructurales en el citoesqueleto neuronal en la zona analizada, el hipocampo, que podrían afectar a la integridad neuronal y, por ende, a su función (**Figura 46A-B**). No obstante, es necesario profundizar en el estudio estructural para corroborar estas observaciones, ya que no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados (**Figura 46C-E**). Para afinar el análisis de las alteraciones en el citoesqueleto neuronal de ratones PFKFB3 KO, sería conveniente emplear técnicas de imagen de mayor resolución para examinar con más detalle las espinas dendríticas. El uso de otros marcadores específicos para componentes del citoesqueleto en combinación con imágenes de mayor resolución podría revelar cambios sutiles no detectados previamente. Además, la ausencia de alteraciones estructurales no excluye la posibilidad de cambios funcionales significativos. Sería interesante investigar la actividad neuronal a través pruebas funcionales como estudios electrofisiológicos o el uso de marcadores de actividad neuronal, para evaluar si estas posibles diferencias estructurales tienen correlatos funcionales medibles, subyacentes a los cambios cognitivos y comportamentales.

En el estudio de la inmunohistoquímica de astrocitos se apreciaron algunos cambios interesantes (**Figura 47**). Se comprobó que, ante un porcentaje de ocupación y número de astrocitos similar en ambos genotipos (**Figura 47D, F**), existe una disminución de la abundancia de GFAP (**Figura 47E**) en los astrocitos hipocampales de los ratones PFKFB3 KO. Además, analizando la *redondez*, parámetro que sirve para definir algunos aspectos de la morfología celular, se observó también que se reducía significativamente en aquellos astrocitos hipocampales carentes de PFKFB3 (**Figura 47G**). Estos astrocitos serían, por tanto, “menos circulares”, es decir, con un soma más retraído y con ramificaciones más cortas. La *reactividad* astrocítica, un fenómeno caracterizado por cambios morfológicos y bioquímicos en los astrocitos es un tema controvertido, especialmente en el contexto de la disminución de reactividad más que del aumento. Aunque el envejecimiento normal parece inducir una reactividad en los astrocitos similar a la observada en ciertas condiciones patológicas (Clarke *et al.*, 2018), la clasificación de los astrocitos como genuinamente reactivos durante el envejecimiento fisiológico sigue siendo incierta (Escartin *et al.*, 2021). La enzima PFKFB3, cuya actividad se ha asociado con un incremento en la proliferación de astrocitos reactivos y una elevada liberación de lactato (Lv *et al.*, 2015), podría representar una diana terapéutica potencial en ciertas patologías neurodegenerativas asociadas con el envejecimiento. Sin embargo, la reducción de GFAP podría resultar en una respuesta astrocítica insuficiente ante lesiones o cambios en las demandas energéticas, lo que potencialmente afectaría la capacidad de reparación y protección del tejido cerebral (Hol y Pekny, 2015; Koronowski *et al.*, 2018; Stelfa *et al.*, 2021). Por otro lado, no se encontraron diferencias en los parámetros analizados para la microglía, aunque sí una tendencia hacia una mayor solidez en los animales PFKFB3 KO con respecto a los WT, apreciada también de forma cualitativa (**Figura 48**). La confirmación de una mayor solidez en los animales sin PFKFB3 astrocítica sería un indicativo de un mayor estado de activación y, de este modo, del incremento de la respuesta defensiva propia de estas células. De ser así, la microglía activa podría estar contribuyendo al mayor estado oxidativo general del cerebro (Wolf, Boddeke y Kettenmann, 2017). Sin embargo, es imprescindible un estudio más profundo de su morfología, empleando imágenes de mayor resolución y otros marcadores específicos de actividad para confirmar estas observaciones (Paolicelli *et al.*, 2022).

Alteraciones cognitivas y conductuales por la eliminación de PFKFB3 en astrocitos

A pesar de que el análisis metabolómico no reveló cambios con una robustez estadística óptima, ni se observaron alteraciones estructurales notables a nivel neuronal entre la condición WT y PFKFB3 KO, no hay duda de que los cambios detectados, y posiblemente aquellos que aún no se han descifrado, son suficientes para alterar la función cerebral que supeditan los procesos cognitivos y conductuales, como se ha confirmado en las pruebas de comportamiento. En primer lugar, se detectó un déficit de la memoria a corto plazo en el grupo de animales joven mediante la prueba de reconocimiento de objetos novedosos, inducido por la ausencia de la PFKFB3 astrocítica (**Figura 27**). En segundo lugar, se observó una afectación de la memoria espacial, que puede ser un reflejo de alteraciones en los procesos de retención de memoria a largo plazo, es decir, de aprendizaje. Esta observación se reflejó en la prueba realizada en el laberinto Barnes, en la que los animales PFKFB3 KO presentaron más dificultades para recordar el cuadrante de escape tras 4 sesiones de entrenamiento previo (**Figura 29**).

Nuestros hallazgos van en consonancia con otras investigaciones previas que evidencian que una disminución de la producción de lactato, derivado de la glucólisis, afecta negativamente a la memoria a largo plazo (Suzuki *et al.*, 2011; Descalzi *et al.*, 2019; Netzahualcoyotzi y Pellerin, 2020). A pesar de las diferencias en las pruebas y de la complejidad de los procesos cognitivos, se ha observado que la inhibición de la producción de lactato compromete el aprendizaje, pero no afecta significativamente a la recuperación de memorias ya formadas (Harris *et al.*, 2019). Esto sugiere que la glucólisis aeróbica es esencial durante la fase de adquisición de la memoria más que en la fase de recuperación. En consonancia con esto, se observó que nuestros sujetos experimentales (PFKFB3 KO) mostraban dificultades en aprender la ubicación de escape, aunque no estaban completamente impedidos de aprender y podían recuperar la memoria y recordar la ubicación, aunque con menor eficacia en comparación con los animales control. Algunos estudios previos enfocados a estudiar la importancia funcional de la ANLS no evidenciaron alteraciones en la memoria a corto plazo. Es posible que parte de estas diferencias con respecto a otros trabajos radiquen en el uso de pruebas más agresivas, i.e., de *inhibitory avoidance* (IA), que condicionan al animal a esquivar un estímulo aversivo (Suzuki *et al.*, 2011; Descalzi *et al.*, 2019). Adicionalmente, en el otro estudio referenciado que sí emplea la prueba de Reconocimiento de Objetos Novedosos, la ausencia de cambios podría estar influenciada por la naturaleza de los objetos usados en el experimento (Netzahualcoyotzi

y Pellerin, 2020); mientras que en nuestro caso, únicamente se cambia el color de los objetos, en otros estudios modifican sustancialmente la forma de los mismos. Estas variaciones sugieren que nuestro método podría requerir una mayor demanda cognitiva para discernir las diferencias sutiles. Además, las particularidades de nuestro modelo experimental, cuyos déficits van más allá de los presumibles defectos en producción de lactato, podrían contribuir a estas diferencias.

Además del análisis cognitivo, se realizó un estudio más detallado de la conducta de estos animales, comenzando por la evaluación de la coordinación motora mediante Rotarod, en la cual no se encontraron diferencias significativas (**Figura 30**). Esto descarta que el resto de las pruebas se vean afectadas, al menos en gran medida, por problemas motores. Se analizó además el comportamiento espontáneo con la prueba de campo abierto u *Openfield*, y no se encontraron diferencias significativas en los parámetros analizados (**Figura 31**), a excepción del tiempo estático que fue superior en ratones PFKFB3 KO jóvenes, compatible con un leve fenotipo de miedo o ansiedad (**Figura 31B**), pero que no es suficiente para determinar con certeza la afectación de esta dimensión emocional. Sin embargo, sí se encontraron indicios de alteraciones del comportamiento exploratorio al analizar el número y duración de los levantamientos (**Figura 32**), pero no se confirmaron con la prueba más específica para este fin, como es el *Hole Board* (**Figura 33**). En las pruebas realizadas a más largo plazo – 10 meses después de la inoculación del vector viral – sí se obtuvieron diferencias en esta prueba, confirmando un deterioro conductual progresivo durante el envejecimiento (**Figura 36A**). En la prueba de la Caja de Blanca/Negra se detectaron alteraciones tempranas tanto en el tiempo transcurrido como en el recorrido realizado en la zona luminosa, indicando alteraciones de tipo emocional relacionadas con comportamientos de miedo en los animales PFKFB3 KO (**Figura 34**). Sin embargo, el deterioro progresivo no se observa en este tipo de comportamientos emocionales, ya que seguimos sin encontrar cambios tras 10 meses de la inoculación viral, ni en el *Openfield*, exceptuando los levantamientos (**Figura 35**), ni en la Caja Blanca/Negra (**Figura 36B**) en la cual tampoco se observa un agravamiento de las alteraciones encontradas en etapas tempranas. Por tanto, la ausencia de PFKFB3 en astrocitos tiene implicaciones que trascienden el ámbito cognitivo y la memoria, subrayando el papel fundamental de los astrocitos en la función cerebral global.

Los resultados obtenidos hasta ahora resaltan la relevancia de PFKFB3 en el comportamiento de los ratones jóvenes, con un enfoque particular en los análisis metabólicos y estructurales

previamente discutidos. Cabe destacar que estas observaciones se limitan al grupo de animales jóvenes, donde se identificaron diferencias comportamentales notables. Este enfoque subraya la función crítica de la glucólisis en edades no avanzadas. Por consiguiente, este trabajo respalda la noción de que la relevancia de la glucólisis disminuye con la edad, evidenciada por la ausencia de alteraciones comportamentales en los machos de edad madura (**Figuras 27, 29, 31-34**). Así, los cambios detectados a largo plazo en el grupo joven podrían reflejar daños permanentes que comprometen de manera irreversible la funcionalidad neuronal. Estas alteraciones no son tan sorprendentes si atendemos a la función glucolítica de la PFKFB3, ya que, como se comentó en la *Introducción*, a medida que el cerebro envejece, se produce una disminución general en el uso de la glucosa y en la energía global, siendo la glucólisis una de las principales rutas más afectadas (Goyal *et al.*, 2014; Dong y Brewer, 2019). Además, en el contexto de este estudio, los animales maduros ya muestran signos de deterioro cognitivo en pruebas como el laberinto Barnes (**Figura 29**), dificultando la identificación de cambios sutiles en su comportamiento. Esto subraya la importancia de considerar la edad y el estado basal de los animales al interpretar los resultados de experimentos que buscan explorar deterioros o afectaciones patológicas.

Papel diferencial de la PFKFB3 astrocítica según el sexo

Finalmente, es importante destacar que, además de la importancia de la edad, el rol de la PFKFB3 parece ser diferente en ratones hembra con respecto a machos. No se encontraron diferencias cognitivas ni conductuales en hembras PFKFB3 KO (**Figuras 49-51**), a excepción de la prueba del laberinto en Y (**Figura 49B**), donde se encontró incluso una mejoría en la memoria de trabajo en estas hembras en comparación con las WT, a diferencia de los machos en los cuales no se encontraron diferencias durante esta prueba. En algunos tejidos, como el muscular, sí se han encontrado diferencias en los niveles proteicos de PFKFB3 entre machos y hembras, confiriéndoles una actividad glucolítica predominante a los machos, frente a la β -oxidación en las hembras (Christianto *et al.*, 2021). Sin embargo, no se han confirmado diferencias basales en cerebro. A falta de aseverar que los niveles proteicos de la PFKFB3 en cerebro son comparables en machos y en hembras, este hallazgo subraya la relevancia de considerar las diferencias sexuales en la investigación y sugiere que los mecanismos subyacentes al papel de la PFKFB3 en astrocitos podrían tener distintas interacciones o modulaciones según el sexo.

Una explicación alternativa a la importancia diferencial de la PFKFB3 entre ambos sexos es la existencia de mecanismos de protección o de compensación presentes en las hembras con respecto a los machos. Esta reflexión nos remite de nuevo al estado redox. Varios estudios confirman la predominancia de una batería de enzimas antioxidantes y, por consiguiente, una menor producción de ROS en las hembras en comparación con los machos, lo que les podría estar confiriendo una ventaja adaptativa (Chen *et al.*, 2011; Kander, Cui y Liu, 2017; Khalifa *et al.*, 2017). Estas evidencias se suman a la observación de que las hembras presentan una mayor formación de supercomplejos de la cadena de transporte de electrones (Clements *et al.*, 2023). Este mayor ensamblaje de supercomplejos podría reflejar una adaptación diferencial en las hembras en comparación con los machos, proporcionando una capa adicional de protección antioxidante que contribuye a mitigar el estrés oxidativo. Este fenómeno está en consonancia con la mayor presencia en cardiomiocitos de hembras frente a machos de COX7RP (del inglés *Cytochrome c oxidase subunit 7A-related protein*), una proteína crucial en la formación de supercomplejos y cuya expresión es dependiente de estrógeno (Clements *et al.*, 2023).

Por un lado, una menor producción de ROS en astrocitos puede tener ciertas consecuencias metabólicas en el propio astrocito, como ya se ha comentado. Por ejemplo, podría tener efectos importantes sobre la vía de señalización de Pi3K/Akt, esencial para regular la supervivencia celular y la autofagia. Una reducción de los niveles de ROS puede atenuar la inhibición que estos ejercen sobre Akt, activando esta vía (Cruz *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2011). Uno de los primeros sustratos identificados de la Akt es la GSK3, implicada en el metabolismo del glucógeno. A través de la vía Pi3K/Akt se va a fosforilar e inactivar la GSK3, reduciendo su inhibición sobre la glucógeno sintasa. Esto puede conducir a un aumento de la síntesis de glucógeno, como la que se observa en los astrocitos carentes de PFKFB3 (Rayasam *et al.*, 2009). Además, la activación de la vía Akt puede conducir a la fosforilación y activación de mTOR, regulador negativo esencial de la autofagia. Por lo tanto, esta activación podría ser la causante del impedimento observado en la ruta autofágica en estos astrocitos. (Li *et al.*, 2011). Más allá de la posible implicación de la vía Akt, una disminución en la producción de ROS podría también atenuar la señalización mediada por HIF1, lo que a su vez podría debilitar aún más la vía glucolítica a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. Esto limitaría, en mayor medida, la capacidad de potenciar la vía glucolítica bajo condiciones de estimulación (Marsin *et al.*, 2002).

Por otro lado, la disminución de las ROS en los astrocitos, a través de un descenso de su repuesta antioxidante, podría estar vinculada con el aumento del estrés oxidativo neuronal como se comentó anteriormente, un factor que, según los hallazgos de este estudio, parece ser crucial en la disfunción observada (Jiménez-Blasco *et al.*, 2015; Vicente-Gutierrez *et al.*, 2019). Adicionalmente a esta posible alteración de la defensa antioxidante astrocítica, parece que puede existir una relación entre los niveles de lactato y la respuesta antioxidante. Así, de acuerdo con el fenómeno de mitohormesis, el metabolismo del lactato podría inducir un incremento moderado y controlado de ROS, que a su vez activaría vías de señalización celular para mejorar la resistencia al estrés y promover la supervivencia. El lactato funcionaría como un antioxidante indirecto, fortaleciendo las defensas celulares contra el daño oxidativo. Sin embargo, en los ratones PFKFB3 KO, este mecanismo de *precondicionamiento antioxidante* inducido por lactato podría estar comprometido, lo que podría explicar el aumento del estrés oxidativo en comparación con los ratones WT (Tauffenberger *et al.*, 2019).

En cualquier caso, hay que admitir que las consecuencias funcionales, incluyendo las alteraciones conductuales y cognitivas detectadas en los ratones PFKFB3 KO jóvenes, no pueden atribuirse exclusivamente a las variaciones en el equilibrio redox. Otros elementos como la disminución de los niveles de lactato como combustible para las neuronas, la hiperactivación del TCA, con su consiguiente desequilibrio de carbonos para la anaplerosis y la neurotransmisión, así como la autofagia, también juegan roles significativos. El trabajo aquí presentado destaca la complejidad de las interacciones metabólicas en el cerebro y subraya la importancia de una visión integradora para comprender las bases moleculares de la cognición y el comportamiento.

En resumen, en esta Tesis Doctoral se ha generado un modelo condicional de ratón que permite la eliminación de la proteína PFKFB3 específicamente en astrocitos. Como consecuencia de ello, se observa una alteración del uso normal de la glucosa, consistente en (i) la reducción parcial de la glucólisis tanto en condiciones de reposo como estimuladas, (ii) la disminución de la producción de lactato y (iii) la alteración en el uso del glucógeno. Es más, la delección de *Pfkfb3* induce una compensación metabólica a través de una remodelación mitocondrial basada en: (i) la hiperactivación del TCA, (ii) el incremento del consumo de oxígeno mitocondrial, (iii) el aumento del ensamblaje de los complejos I y III mitocondriales, y (iv) la disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno. Además, la eliminación de la PFKFB3 inhibe el flujo autofágico en astrocitos. De los estudios de comportamiento, se

puede deducir que la eliminación de la PFKFB3 en astrocitos de ratones macho jóvenes provoca deficiencias en memoria y cambios comportamentales asociados con alteraciones de la conducta exploratoria y fenotipos emocionales de miedo y ansiedad. Es más, la relevancia del papel de la PFKFB3 astrocítica es vital en etapas más tempranas de la edad adulta, a juzgar por la ausencia de alteraciones comportamentales en ratones maduros. Finalmente, la PFKFB3 astrocítica presenta un papel diferencial según el sexo, que queda reflejado en las distintas respuestas observadas en pruebas de cognición y conducta entre machos y hembras.

CONCLUSIONES

Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, se han alcanzado las siguientes conclusiones:

1. **La enzima PFKFB3 contribuye decisivamente al mantenimiento del conocido fenotipo glucolítico en astrocitos de ratón adulto.** Esta observación proporciona un mecanismo específico que ayuda a explicar el modelo de la lanzadera de lactato astrocito-neurona.
2. **La utilización normal del glucógeno en astrocitos en condiciones basales requiere PFKFB3.** Este hallazgo indica que la glucolisis, gracias a su control por la PFKFB3, es esencial para el uso normal de las reservas de glucógeno astrocíticas en estado de reposo. Sin embargo, esta dependencia es diferente ante una mayor demanda energética.
3. **La PFKFB3 participa en el mantenimiento del flujo autofágico y en la escasa actividad del ciclo tricarboxílico, el bajo consumo de oxígeno mitocondrial, el desensamblaje del supercomplejo I-III y la elevada producción de ROS en los astrocitos.** Estas observaciones indican que la PFKFB3 ejerce una gran influencia sobre las principales características metabólicas de los astrocitos que tienen impacto sobre la funcionalidad neuronal.
4. **La memoria, la conducta exploratoria y los fenotipos emocionales como miedo y ansiedad necesitan de la PFKFB3 astrocítica de forma evidente en adultos jóvenes, pero no en maduros.** Estos resultados son compatibles con la idea de que la glucolisis es una ruta metabólica que pierde importancia durante el envejecimiento, probablemente como consecuencia de la disminución generalizada del consumo cerebral de glucosa.
5. **El sexo determina la influencia de la PFKFB3 astrocítica en la capacidad cognitiva y otros estados comportamentales, siendo los machos más dependientes de la PFKFB3 que las hembras.** Este hallazgo podría deberse a los mecanismos de protección frente al estrés oxidativo, predominantes en hembras.

BIBLIOGRAFÍA

- Acín-Pérez, R. *et al.* (2008) «Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes», *Molecular Cell*, 32(4), pp. 529-539. doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.021.
- Acuña, A. I. *et al.* (2013) «A failure in energy metabolism and antioxidant uptake precede symptoms of Huntington's disease in mice», *Nature Communications*, 4(May), pp. 1-13. doi: 10.1038/ncomms3917.
- Allaman, I., Bélanger, M. y Magistretti, P. J. (2011) «Astrocyte-neuron metabolic relationships: For better and for worse», *Trends in Neurosciences*, 34(2), pp. 76-87. doi: 10.1016/j.tins.2010.12.001.
- Almeida, A. *et al.* (2001) «Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: The role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 98(26), pp. 15294-15299. doi: 10.1073/Proceedings of the National Academy of Sciences of US.261560998.
- Almeida, A. y Medina, J. M. (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. doi: 10.1016/S1385-299X(97)00044-5.
- Almeida, A., Moncada, S. y 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), pp. 45-51. doi: 10.1038/ncb1080.
- Antunes, M. y Biala, G. (2012) «The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications», *Cognitive Processing*, 13(2), pp. 93-110. doi: 10.1007/s10339-011-0430-z.
- Ardanaz, C. G. *et al.* (2022) «GLUT1 ablation in astrocytes paradoxically improves central and peripheral glucose metabolism via enhanced insulin-stimulated ATP release», *Biorxiv*. doi.org/10.1101/2022.10.06.511112
- Ashrafi, G. *et al.* (2017) «GLUT4 Mobilization Supports Energetic Demands of Active Synapses», *Neuron*, 93(3), pp. 606-615.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2016.12.020.
- Bando, H. *et al.* (2005) «Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer», *Clinical Cancer Research*, 11(16), pp. 5784-5792. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0149.
- Barros, L. F. *et al.* (2021) «Aerobic Glycolysis in the Brain: Warburg and Crabtree Contra Pasteur», *Neurochemical Research*, 46(1), pp. 15-22. doi: 10.1007/s11064-020-02964-w.
- Beer, B. *et al.* (2018) «Substrate scope of a dehydrogenase from *Sphingomonas* species A1 and its potential application in the synthesis of rare sugars and sugar derivatives», *Microbial Biotechnology*, 11(4), pp. 747-758. doi: 10.1111/1751-7915.13272.
- Bélanger, M., Allaman, I. y Magistretti, P. J. (2011) «Differential effects of pro- and anti-inflammatory cytokines alone or in combinations on the metabolic profile of astrocytes», *Journal of Neurochemistry*, 116(4), pp. 564-576. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07135.x.
- La Belle Flynn, A. *et al.* (2019) «Autophagy inhibition elicits emergence from metastatic dormancy by inducing and stabilizing Pfkfb3 expression», *Nature Communications*, 10(1), pp. 1-15. doi: 10.1038/s41467-019-11640-9.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., S. L. (2014), en «*Bioquímica. Curso básico*».
- Blázquez, C. *et al.* (1998) «Role of carnitine palmitoyltransferase I in the control of ketogenesis in primary cultures of rat astrocytes», *Journal of Neurochemistry*, 71(4), pp. 1597-1606. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71041597.x.
- Bolaños, J. P. (2016) «Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity», *Journal of Neurochemistry*, 139, pp. 115-125. doi: 10.1111/jnc.13486.
- Bolaños, J. P. y Almeida, A. (2010) «The pentose-phosphate pathway in neuronal survival against nitrosative stress», *IUBMB Life*, 62(1), pp. 14-18. doi: 10.1002/iub.280.
- Borkum, J. M. (2023) «The Tricarboxylic Acid Cycle as a Central Regulator of the Rate of Aging: Implications for Metabolic Interventions», *Advanced Biology*, 7(7), pp. 1-17. doi: 10.1002/adbi.202300095.
- Bouzier-Sore, A. K. *et al.* (2006) «Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: A comparative NMR study», *European Journal of Neuroscience*, 24(6), pp. 1687-1694. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05056.x.
- Broeks, M. H. *et al.* (2023) «The malate-aspartate shuttle is important for de novo serine biosynthesis», *Cell Reports*, 42(9), p. 113043. doi: 10.1016/j.celrep.2023.113043.
- Brown, A. M. *et al.* (2005) «Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during aglycemia or intense stimulation in mouse white matter», *Journal of Neuroscience Research*, 79(1-2), pp. 74-80. doi: 10.1002/jnr.20335.
- Cadet, J. y Richard Wagner, J. (2013) «DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation», *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2), pp. 1-18. doi: 10.1101/cshperspect.a012559.
- Cavalier, M. C. *et al.* (2012) «Molecular basis of the fructose-2,6-bisphosphatase reaction of PFKFB3: Transition state and the C-terminal function», *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 80(4), pp. 1143-1153. doi: 10.1002/prot.24015.
- Chai, H. *et al.* (2017) «Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence», *Neuron*, 95(3), pp. 531-549.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2017.06.029.
- Chan, K. Y. *et al.* (2017) «Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems», *Nature Neuroscience*, 20(8), pp. 1172-1179. doi: 10.1038/nn.4593.
- Chen, Y. *et al.* (2011) «Evaluation of gender-related differences in various oxidative stress enzymes in mice», *Chinese Journal of Physiology*, 54(6), pp. 385-390. doi: 10.4077/CJP.2011.AMM080.
- Chesney, J. *et al.* (1999) «An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: Role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 96(6), pp. 3047-3052. doi: 10.1073/Proceedings of the National Academy of Sciences of US.96.6.3047.
- Christianto, A. *et al.* (2021) «Sex differences in metabolic pathways are regulated by Pfkfb3 and Pdk4 expression in rodent muscle», *Communications Biology*, 4(1). doi: 10.1038/s42003-021-02790-y.

- Chuquet, J. *et al.* (2010) «Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex», *Journal of Neuroscience*, 30(45), pp. 15298-15303. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0762-10.2010.
- Clarke, L. E. *et al.* (2018) «Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 115(8), pp. E1896-E1905. doi: 10.1073/Proceedings of the National Academy of Sciences of US.1800165115.
- Clements, R. T. *et al.* (2023) «Sexual dimorphism in bidirectional SR-mitochondria crosstalk in ventricular cardiomyocytes», *Basic Research in Cardiology*, 118(1), pp. 1-22. doi: 10.1007/s00395-023-00988-1.
- Costa Leite, T. *et al.* (2007) «Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis», *Biochemical Journal*, 408(1), pp. 123-130. doi: 10.1042/BJ20070687.
- Cruz, C. M. *et al.* (2007) «ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages», *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), pp. 2871-2879. doi: 10.1074/jbc.M608083200.
- Cruz, E. *et al.* (2022) «Differential role of neuronal glucose and PFKFB3 in memory formation during development», *Glia*, 70(11), pp. 2207-2231. doi: 10.1002/glia.24248.
- Curtis, M. J. *et al.* (2018) «Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers», *British Journal of Pharmacology*, 175(7), pp. 987-993. doi: 10.1111/bph.14153.
- Davis, C. H. O. *et al.* (2014) «Transcellular degradation of axonal mitochondria», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 111(26), pp. 9633-9638. doi: 10.1073/PNAS.1404651111.
- Delacre, M., Lakens, D. y Leys, C. (2017) «Why psychologists should by default use welch's t-Test instead of student's t-Test», *International Review of Social Psychology*, 30(1), pp. 92-101. doi: 10.5334/irsp.82.
- Delbridge, L. M. *et al.* (2022) «Glycophagy — the physiological perspective on a newly characterized glycogen-selective autophagy», *Current Opinion in Physiology*, 30(October), p. 100598. doi: 10.1016/j.cophys.2022.100598.
- Denker, N. *et al.* (2023) «Consumption and Metabolism of Extracellular Pyruvate by Cultured Rat Brain Astrocytes», *Neurochemical Research*, 48(5), pp. 1438-1454. doi: 10.1007/s11064-022-03831-6.
- Descalzi, G. *et al.* (2019) «Lactate from astrocytes fuels learning-induced mRNA translation in excitatory and inhibitory neurons», *Communications Biology*, 2(1). doi: 10.1038/s42003-019-0495-2.
- Díaz-García, C. M. *et al.* (2017) «Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake», *Cell Metabolism*, 26(2), pp. 361-374.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2017.06.021.
- Dienel, G. A. y Cruz, N. F. (2015) «Contributions of glycogen to astrocytic energetics during brain activation», *Metabolic Brain Disease*, 30(1), pp. 281-298. doi: 10.1007/s11011-014-9493-8.

- Doménech, E. *et al.* (2015) «AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest», *Nature Cell Biology*, 17(10), pp. 1304-1316. doi: 10.1038/ncb3231.
- Dong, Y. y Brewer, G. J. (2019) «Global Metabolic Shifts in Age and Alzheimer's Disease Mouse Brains Pivot at NAD⁺/NADH Redox Sites», *Journal of Alzheimer's Disease*, 71(1), pp. 119-140. doi: 10.3233/JAD-190408.
- Le Douce, J. *et al.* (2020) «Impairment of Glycolysis-Derived L-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease», *Cell Metabolism*, 31(3), pp. 503-517.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.004.
- Dringen, R., Gebhardt, R. y Hamprecht, B. (1993) «Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells», *Brain Research*, 623(2), pp. 208-214. doi: 10.1016/0006-8993(93)91429-V.
- Dringen, R., Gutterer, J. M. y Hirrlinger, J. (2000) «Glutathione metabolism in brain: Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species», *European Journal of Biochemistry*, 267(16), pp. 4912-4916. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01597.x.
- Dringen, R. y Hamprecht, B. (1993) «Differences in glycogen metabolism in astroglia-rich primary cultures and sorbitol-selected astroglial cultures derived from mouse brain», *Glia*, 8(3), pp. 143-149. doi: 10.1002/glia.440080302.
- Dringen, R., Pfeiffer, B. y Hamprecht, B. (1999) «Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: Supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione», *Journal of Neuroscience*, 19(2), pp. 562-569. doi: 10.1523/jneurosci.19-02-00562.1999.
- Duran, J. *et al.* (2020) «Lack of Astrocytic Glycogen Alters Synaptic Plasticity but Not Seizure Susceptibility», *Molecular Neurobiology*, 57(11), pp. 4657-4666. doi: 10.1007/s12035-020-02055-5.
- Duran, J. *et al.* (2021) «Astrocytic glycogen accumulation drives the pathophysiology of neurodegeneration in Lafora disease», *Brain*, 144(8), pp. 2349-2360. doi: 10.1093/brain/awab110.
- Ebert, D., Haller, R. G. y Walton, M. E. (2003) «Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy», *Journal of Neuroscience*, 23(13), pp. 5928-5935. doi: 10.1523/jneurosci.23-13-05928.2003.
- Edmond, J. *et al.* (1987) «Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture», *Journal of Neuroscience Research*, 18(4), pp. 551-561. doi: 10.1002/jnr.490180407.
- Escartin, C. *et al.* (2021) «Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions», *Nature Neuroscience*. Springer US, 24(3), pp. 312-325. doi: 10.1038/s41593-020-00783-4.
- Fame, R. M. *et al.* (2019) «A concerted metabolic shift in early forebrain alters the CSF proteome and depends on MYC downregulation for mitochondrial maturation», *Development*, 146(20). doi: 10.1242/dev.182857.
- Feng, Y. *et al.* (2014) «The machinery of macroautophagy», *Cell Research*, 24(1), pp. 24-41. doi: 10.1038/cr.2013.168.

- Fernández-Moncada, I. *et al.* (2018) «Neuronal control of astrocytic respiration through a variant of the Crabtree effect», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 115(7), pp. 1623-1628. doi: 10.1073/PNAS of US.1716469115.
- Ferreira, J. M., Burnett, A. L. y Rameau, G. A. (2011) «Activity-dependent regulation of surface glucose transporter-3», *Journal of Neuroscience*, 31(6), pp. 1991-1999. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1850-09.2011.
- Foo, L. C. y Dougherty, J. D. (2013) «Aldh1L1 is Expressed by Postnatal Neural Stem Cells In Vivo», *Glia*, 61(9), pp. 1533-1541. doi: 10.1002/glia.22539.
- Fox, P. T. *et al.* (1988) «Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity», *Science*, 241(4864), pp. 462-464. doi: 10.1126/science.3260686.
- Franklin, D. A. *et al.* (2016) «P53 coordinates DNA repair with nucleotide synthesis by suppressing PFKFB3 expression and promoting the pentose phosphate pathway», *Scientific Reports*, 6(November), pp. 1-13. doi: 10.1038/srep38067.
- Fu, W. *et al.* (2015) «Bioenergetic mechanisms in astrocytes may contribute to amyloid plaque deposition and toxicity», *Journal of Biological Chemistry*, 290(20), pp. 12504-12513. doi: 10.1074/jbc.M114.618157.
- Furuya, E., Yokoyama, M. y Uyeda, K. (1982) «An enzyme that catalyzes hydrolysis of fructose-2,6-bisphosphate», *Biochemical and biophysical research communications*, 105(1), pp. 264-270.
- Garcia-Macia, M. *et al.* (2021) «A Mammalian Target of Rapamycin-Perilipin 3 (mTORC1-Plin3) Pathway is essential to Activate Lipophagy and Protects Against Hepatosteatosis», *Hepatology*, 74(6), pp. 3441-3459. doi: 10.1002/hep.32048.
- Garedew, A., Henderson, S. O. y Moncada, S. (2010) «Activated macrophages utilize glycolytic ATP to maintain mitochondrial membrane potential and prevent apoptotic cell death», *Cell Death and Differentiation*, 17(10), pp. 1540-1550. doi: 10.1038/cdd.2010.27.
- Garwood, C. J. *et al.* (2011) «Astrocytes are important mediators of A β -induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture», *Cell Death and Disease*, 2(6), pp. e167-9. doi: 10.1038/cddis.2011.50.
- Glatigny, M. *et al.* (2019) «Autophagy Is Required for Memory Formation and Reverses Age-Related Memory Decline», *Current Biology*, 29(3), pp. 435-448.e8. doi: 10.1016/j.cub.2018.12.021.
- Goyal, M. S. *et al.* (2014) «Aerobic glycolysis in the human brain is associated with development and neonatal gene expression», *Cell Metabolism*, 19(1), pp. 49-57. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.020.
- Goyal, M. S. *et al.* (2017) «Loss of Brain Aerobic Glycolysis in Normal Human Aging», *Cell Metabolism*, 26(2), pp. 353-360.e3. doi: 10.1016/j.cmet.2017.07.010.
- Goyal, M. S. *et al.* (2023) «Brain aerobic glycolysis and resilience in Alzheimer disease», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 120(7), pp. 1-8. doi: 10.1073/PNAS.2212256120.
- Halim, N. D. *et al.* (2010) «Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons», *Glia*, 58(10), pp. 1168-1176. doi: 10.1002/glia.20996.

- Harris, J. J., Jolivet, R. y Attwell, D. (2012) «Synaptic Energy Use and Supply», *Neuron*, 75(5), pp. 762-777. doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.019.
- Harris, R. A. *et al.* (2019) «Aerobic glycolysis is required for spatial memory acquisition but not memory retrieval in mice», *eNeuro*, 6(1), pp. 1-9. doi: 10.1523/ENEURO.0389-18.2019.
- Hasel, P. *et al.* (2017) «Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism», *Nature Communications*, 8(May). doi: 10.1038/ncomms15132.
- Heath-Engel, H. M. y Shore, G. C. (2006) «Mitochondrial membrane dynamics, cristae remodelling and apoptosis», *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(5-6), pp. 549-560. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.02.006.
- Henneberger, C. *et al.* (2010) «Long-term potentiation depends on release of d-serine from astrocytes», *Nature*, 463(7278), pp. 232-236. doi: 10.1038/nature08673.
- Henriques, B. J. *et al.* (2021) «Electron transfer flavoprotein and its role in mitochondrial energy metabolism in health and disease», *Gene*, 776(December 2020). doi: 10.1016/j.gene.2021.145407.
- Hernández-Camacho, J. D. *et al.* (2021) «Coenzyme q at the hinge of health and metabolic diseases», *Antioxidants*, 10(11). doi: 10.3390/antiox10111785.
- Herrero-Mendez, A. *et al.* (2009) «The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1», *Nature Cell Biology*, 11(6), pp. 747-752. doi: 10.1038/ncb1881.
- Heydasch, U. *et al.* (2021) «Functional diversity of PFKFB3 splice variants in glioblastomas», *PLoS ONE*, 16(7 July), pp. 1-23. doi: 10.1371/journal.pone.0241092.
- Hol, E. M. y Pekny, M. (2015) «Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system», *Current Opinion in Cell Biology*, 32, pp. 121-130. doi: 10.1016/j.ceb.2015.02.004.
- Holt, M. G. (2023) «Astrocyte heterogeneity and interactions with local neural circuits», *Essays in Biochemistry*, 67(1), pp. 93-106. doi: 10.1042/EBC20220136.
- Ioannou, M. S. *et al.* (2019) «Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity», *Cell*, 177(6), pp. 1522-1535.e14. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.001.
- Israelsen, W. J. y Vander Heiden, M. G. (2015) «Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer», *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 43, pp. 43-51. doi: 10.1016/j.semcd.2015.08.004.
- Jakobsen, E. *et al.* (2017) «Glycogen Shunt Activity and Glycolytic Supercompensation in Astrocytes May Be Distinctly Mediated via the Muscle Form of Glycogen Phosphorylase», *Neurochemical Research*, 42(9), pp. 2490-2494. doi: 10.1007/s11064-017-2267-z.
- Jang, S. R. *et al.* (2016) «Glycolytic Enzymes Localize to Synapses under Energy Stress to Support Synaptic Function», *Neuron*, 90(2), pp. 278-291. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.011.

- Jansen, R. S. *et al.* (2015) «N-lactoyl-amino acids are ubiquitous metabolites that originate from CNDP2-mediated reverse proteolysis of lactate and amino acids», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 112(21), pp. 6601-6606. doi: 10.1073/PNAS.1424638112.
- Jenkins, C. M. *et al.* (2011) «Reversible high affinity inhibition of phosphofructokinase-1 by Acyl-CoA: A mechanism integrating glycolytic flux with lipid metabolism», *Journal of Biological Chemistry*, 286(14), pp. 11937-11950. doi: 10.1074/jbc.M110.203661.
- Jiménez-Blasco, D. *et al.* (2015) «Astrocyte NMDA receptors' activity sustains neuronal survival through a Cdk5-Nrf2 pathway», *Cell Death and Differentiation*, 22(11), pp. 1877-1889. doi: 10.1038/cdd.2015.49.
- Jiménez-Blasco, D. *et al.* (2023) «Weak neuronal glycolysis sustains cognition and organismal fitness», *Biorxiv*, pp. 1-37. (En revisión)
- Jiménez-Blasco, D., Almeida, A. y Bolaños, J. P. (2023) «Brightness and shadows of mitochondrial ROS in the brain», *Neurobiology of Disease*, 184(February), pp. 0-4. doi: 10.1016/j.nbd.2023.106199.
- Juaristi, I. *et al.* (2019) «Extracellular ATP and glutamate drive pyruvate production and energy demand to regulate mitochondrial respiration in astrocytes», *Glia*, 67(4), pp. 759-774. doi: 10.1002/glia.23574.
- Jurga, A. M. *et al.* (2021) «Beyond the GFAP-astrocyte protein markers in the brain», *Biomolecules*, 11(9). doi: 10.3390/biom11091361.
- Kanai, S. *et al.* (2019) «Phosphofructokinase-1 and fructose biphosphatase-1 in canine liver and kidney», *Journal of Veterinary Medical Science*, 81(10), pp. 1515-1521. doi: 10.1292/jvms.19-0361.
- Kander, M. C., Cui, Y. y Liu, Z. (2017) «Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases», *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(5), pp. 1024-1032. doi: 10.1111/jcmm.13038.
- Karabiyik, C. *et al.* (2021) «Glucose starvation induces autophagy via ULK1-mediated activation of PIKfyve in an AMPK-dependent manner», *Developmental Cell*, 56(13), pp. 1961-1975.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2021.05.010.
- Karagiannis, A. *et al.* (2016) «Hemichannel-mediated release of lactate», *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(7), pp. 1202-1211. doi: 10.1177/0271678X15611912.
- Karpf, J. *et al.* (2022) «Dentate gyrus astrocytes exhibit layer-specific molecular, morphological and physiological features», *Nature Neuroscience*, 25(12), pp. 1626-1638. doi: 10.1038/s41593-022-01192-5.
- Kessler, R. y Eschrich, K. (2001) «Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain», *Molecular Brain Research*, 87(2), pp. 190-195. doi: 10.1016/S0169-328X(01)00014-6.
- Khalifa, A. R. M. *et al.* (2017) «Sex-specific differences in mitochondria biogenesis, morphology, respiratory function, and ROS homeostasis in young mouse heart and brain», *Physiological Reports*, 5(6), pp. 1-19. doi: 10.14814/phy2.13125.

- Kim, H. Y., Huang, B. X. y Spector, A. A. (2014) «Phosphatidylserine in the brain: Metabolism and function», *Progress in Lipid Research*, 56(1), pp. 1-18. doi: 10.1016/j.plipres.2014.06.002.
- Kim, S. G. *et al.* (2006) «Crystal structure of the hypoxia-inducible form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3): A possible new target for cancer therapy», *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), pp. 2939-2944. doi: 10.1074/jbc.M511019200.
- Klarer, A. C. *et al.* (2014) «Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) induces autophagy as a survival mechanism», *Cancer & Metabolism*, 2(1), pp. 1-14. doi: 10.1186/2049-3002-2-2.
- Kler, R. S., Sherratt, H. S. A. y Turnbull, D. M. (1992) «The measurement of mitochondrial β -oxidation by release of $3\text{H}_2\text{O}$ from $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ hexadecanoate: Application to skeletal muscle and the use of inhibitors as models of metabolic disease», *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 47(2), pp. 145-156. doi: 10.1016/0885-4505(92)90018-T.
- Koepsell, H. (2020) «Glucose transporters in brain in health and disease», *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 472(9), pp. 1299-1343. doi: 10.1007/s00424-020-02441-x.
- Koh, W. *et al.* (2017) «AAV-mediated astrocyte-specific gene expression under human ALDH1L1 promoter in mouse thalamus», *Experimental Neurobiology*, 26(6), pp. 350-361. doi: 10.5607/en.2017.26.6.350.
- Koronowski, K. B. *et al.* (2018) «Metabolomics based identification of SIRT5 and protein kinase C epsilon regulated pathways in brain», *Frontiers in Neuroscience*, 12(january), pp. 1-13. doi: 10.3389/fnins.2018.00032.
- Kulkarni, A. *et al.* (2020) «Differential regulation of autophagy during metabolic stress in astrocytes and neurons», *Autophagy*. Taylor & Francis, 16(9), pp. 1651-1667. doi: 10.1080/15548627.2019.1703354.
- Lane, A. N. y Fan, T. W. M. (2015) «Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis», *Nucleic Acids Research*, 43(4), pp. 2466-2485. doi: 10.1093/nar/gkv047.
- Lanjakornsiripan, D. *et al.* (2018) «Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers», *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-03940-3.
- Lapresa, R. *et al.* (2022) «Amyloid- β Induces Cdh1-Mediated Rock2 Stabilization Causing Neurodegeneration», *Frontiers in Pharmacology*, 13(April), pp. 1-12. doi: 10.3389/fphar.2022.884470.
- Lapunte-Brun, E. *et al.* (2013) «Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain», *Science*, 340(6140), pp. 1567-1570. doi: 10.1126/science.1230381.
- Lee, Y. *et al.* (2008) «GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression», *Glia*, 56(5), pp. 481-493. doi: 10.1002/glia.20622.
- Lee, Y. B. *et al.* (2022) «Multiple functions of pyruvate kinase M2 in various cell types», *Journal of Cellular Physiology*, 237(1), pp. 128-148. doi: 10.1002/jcp.30536.

- Li, F. L. *et al.* (2018) «Acetylation accumulates PFKFB3 in cytoplasm to promote glycolysis and protects cells from cisplatin-induced apoptosis», *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-02950-5.
- Li, J. *et al.* (2022) «Overexpression of PFKFB3 promotes cell glycolysis and proliferation in renal cell carcinoma», *BMC Cancer*. BioMed Central, 22(1), pp. 1-11. doi: 10.1186/s12885-022-09183-2.
- Li, Z. yue *et al.* (2011) «Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(1), pp. 5-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.046.
- Linnerbauer, M., Wheeler, M. A. y Quintana, F. J. (2020) «Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation», *Neuron*. Elsevier Inc., 108(4), pp. 608-622. doi: 10.1016/j.neuron.2020.08.012.
- Liu, X. *et al.* (2022) «Lactylation, an emerging hallmark of metabolic reprogramming: Current progress and open challenges», *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10(August), pp. 1-18. doi: 10.3389/fcell.2022.972020.
- Lopez-Fabuel, I. *et al.* (2016) «Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 113(46), pp. 13063-13068. doi: 10.1073/Pnas.1613701113.
- Lovatt, D. *et al.* (2007) «The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex», *Journal of Neuroscience*, 27(45), pp. 12255-12266. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3404-07.2007.
- Lundgaard, I., Li, B., Xie, L., Kang, H., Sanggaard, S., Haswell, J. D. R., *et al.* (2015) «Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism», *Nature Communications*, 6. doi: 10.1038/ncomms7807.
- Lundgaard, I., Li, B., Xie, L., Kang, H., Sanggaard, S., Sun, W., *et al.* (2015) «Increases in Cerebral Metabolism», *Nature communications*, pp. 1-27. doi: 10.1038/ncomms7807.Direct.
- Lv, Y. *et al.* (2015) «PFKFB3-mediated glycolysis is involved in reactive astrocyte proliferation after oxygen-glucose deprivation/reperfusion and is regulated by Cdh1», *Neurochemistry International*, 91, pp. 26-33. doi: 10.1016/j.neuint.2015.10.006.
- Mächler, P. *et al.* (2016) «In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons», *Cell Metabolism*, 23(1), pp. 94-102. doi: 10.1016/j.cmet.2015.10.010.
- Magistretti, P. J. *et al.* (1994) «Regulation of astrocyte energy metabolism by neurotransmitters», *Kidney and Blood Pressure Research*, 17(3-4), pp. 168-171. doi: 10.1159/000173810.
- Magistretti, P. J. (2006) «Neuron-glia metabolic coupling and plasticity», *Journal of Experimental Biology*, 209(12), pp. 2304-2311. doi: 10.1242/jeb.02208.
- Magistretti, P. J. y Allaman, I. (2018) «Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule», *Nature Reviews Neuroscience*, 19(4), pp. 235-249. doi: 10.1038/nrn.2018.19.
- Magistretti, P. J. y Chatton, J. Y. (2005) «Relationship between L-glutamate-regulated intracellular Na⁺ dynamics and ATP hydrolysis in astrocytes», *Journal of Neural Transmission*, 112(1), pp. 77-85. doi: 10.1007/s00702-004-0171-6.

- Manning, B. D. y Cantley, L. C. (2007) «AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream», *Cell*, 129(7), pp. 1261-1274. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
- Marin-Hernandez, A. *et al.* (2009) «HIF-1 α ; Modulates Energy Metabolism in Cancer Cells by Inducing Over-Expression of Specific Glycolytic Isoforms», *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(9), pp. 1084-1101. doi: 10.2174/138955709788922610.
- Marsin, A. S. *et al.* (2002) «The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase», *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), pp. 30778-30783. doi: 10.1074/jbc.M205213200.
- Martano, G. *et al.* (2016) «Biosynthesis of glycerol phosphate is associated with long-term potentiation in hippocampal neurons», *Metabolomics*, 12(8), pp. 1-8. doi: 10.1007/s11306-016-1083-9.
- Martínez-García, G. G. *et al.* (2021) «Autophagy deficiency by atg4b loss leads to metabolomic alterations in mice», *Metabolites*, 11(8), pp. 1-18. doi: 10.3390/metabo11080481.
- Maugard, M. *et al.* (2021) «L-Serine links metabolism with neurotransmission», *Progress in Neurobiology*, 197(July 2020). doi: 10.1016/j.pneurobio.2020.101896.
- McMullen, E. *et al.* (2023) «Glycolytically impaired Drosophila glial cells fuel neural metabolism via β -oxidation», *Nature Communications*, 14(1). doi: 10.1038/s41467-023-38813-x.
- Mergenthaler, P. *et al.* (2013) «Sugar for the brain: The role of glucose in physiological and pathological brain function», *Trends in Neurosciences*, 36(10), pp. 587-597. doi: 10.1016/j.tins.2013.07.001.
- Meunier, C. N. J. *et al.* (2016) «D-Serine and glycine differentially control neurotransmission during visual cortex critical period», *PLoS ONE*, 11(3), pp. 1-20. doi: 10.1371/journal.pone.0151233.
- Meyer, N. y Rinholm, J. E. (2021) «Mitochondria in myelinating oligodendrocytes: Slow and out of breath?», *Metabolites*, 11(6). doi: 10.3390/metabo11060359.
- Michels, P. A. M. y Rigden, D. J. (2006) «Evolutionary analysis of fructose 2,6-bisphosphate metabolism», *IUBMB Life*, 58(3), pp. 133-141. doi: 10.1080/15216540600688280.
- Milenkovic, D. *et al.* (2023) «Preserved respiratory chain capacity and physiology in mice with profoundly reduced levels of mitochondrial respirasomes», *Cell Metabolism*, pp. 1799-1813. doi: 10.1016/j.cmet.2023.07.015.
- Minchenko, O., Opentanova, I. y Caro, J. (2003) «Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6- biphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo», *FEBS Letters*, 554(3), pp. 264-270. doi: 10.1016/S0014-5793(03)01179-7.
- Miyazawa, H. *et al.* (2017) «Rewiring of embryonic glucose metabolism via suppression of PFK-1 and aldolase during mouse chorioallantoic branching», *Development*, 144(1), pp. 63-73. doi: 10.1242/dev.138545.
- Mongeon, R., Venkatachalam, V. y Yellen, G. (2016) «Cytosolic NADH-NAD⁺ Redox Visualized in Brain Slices by Two-Photon Fluorescence Lifetime Biosensor Imaging», *Antioxidants and Redox Signaling*, 25(10), pp. 553-563. doi: 10.1089/ars.2015.6593.

- Morant-Ferrando, B. *et al.* (2023) «Fatty acid oxidation organizes mitochondrial supercomplexes to sustain astrocytic ROS and cognition», *Nature Metabolism*, 5(8), pp. 1290-1302. doi: 10.1038/s42255-023-00835-6.
- Moriyama, Y. y Futai, M. (1990) «H⁺-ATPase, a primary pump for accumulation of neurotransmitters, is a major constituent of brain synaptic vesicles», *Biochemical and biophysical research communications*, 173(1), pp. 443-448.
- Mosconi, L., Pupi, A. y De Leon, M. J. (2008) «Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease», *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, pp. 180-195. doi: 10.1196/annals.1427.007.
- Motori, E. *et al.* (2013) «Inflammation-induced alteration of astrocyte mitochondrial dynamics requires autophagy for mitochondrial network maintenance», *Cell Metabolism*, 18(6), pp. 844-859. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.005.
- Muraleedharan, R. *et al.* (2020) «AMPK-Regulated Astrocytic Lactate Shuttle Plays a Non-Cell-Autonomous Role in Neuronal Survival», *Cell Reports*, 32(9). doi: 10.1016/j.celrep.2020.108092.
- Murat, C. D. B. y García-Cáceres, C. (2021) «Astrocyte gliotransmission in the regulation of systemic metabolism», *Metabolites*, 11(11). doi: 10.3390/metabo11110732.
- Murphy-Royal, C. *et al.* (2020) «Stress gates an astrocytic energy reservoir to impair synaptic plasticity», *Nature Communications*, 11(1). doi: 10.1038/s41467-020-15778-9.
- Natarajaseenivasan, K. *et al.* (2022) «Citrate shuttling in astrocytes is required for processing cocaine-induced neuron-derived excess peroxidated fatty acids», *iScience*, 25(11), p. 105407. doi: 10.1016/j.isci.2022.105407.
- Netzahualcoyotzi, C. y Pellerin, L. (2020) «Neuronal and astroglial monocarboxylate transporters play key but distinct roles in hippocampus-dependent learning and memory formation», *Progress in Neurobiology*, 194(July), p. 101888. doi: 10.1016/j.pneurobio.2020.101888.
- Nieweg, K., Schaller, H. y Pfrieder, F. W. (2009) «Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats», *Journal of Neurochemistry*, 109(1), pp. 125-134. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05917.x.
- Novack, G. V. *et al.* (2020) «Mitochondrial Supercomplexes: Physiological Organization and Dysregulation in Age-Related Neurodegenerative Disorders», *Frontiers in Endocrinology*, 11(September), pp. 1-9. doi: 10.3389/fendo.2020.00600.
- Novellademunt, L. *et al.* (2012) «Progestins activate 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) in breast cancer cells», *Biochemical Journal*, 442(2), pp. 345-356. doi: 10.1042/BJ20111418.
- Novellademunt, L. *et al.* (2013) «PFKFB3 activation in cancer cells by the p38/MK2 pathway in response to stress stimuli», *Biochemical Journal*, 452(3), pp. 531-543. doi: 10.1042/BJ20121886.
- Okamura, N. y Sakakibara, R. (1998) «A common phosphorylation site for cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C in human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase», *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 62(10), pp. 2039-2042.

- Ortiz-Rodriguez, A. y Arevalo, M. A. (2020) «The contribution of astrocyte autophagy to systemic metabolism», *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). doi: 10.3390/ijms21072479.
- Owen, O. E. (2005) «Mini-Series : Paths to Discovery Ketone Bodies as a Fuel for the Brain during Starvation THE STATUS OF OUR KNOWLEDGE OF STARVATION AND BRAIN», *Liver*, 33(4), pp. 246-251.
- Öz, G. *et al.* (2004) «Neuroglial metabolism in the awake rat brain: CO₂ fixation increases with brain activity», *Journal of Neuroscience*, 24(50), pp. 11273-11279. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3564-04.2004.
- Panov, A. *et al.* (2014) «Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system», *BioMed Research International*, 2014. doi: 10.1155/2014/472459.
- Paolicelli, R. C. *et al.* (2022) «Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads», *Neuron*, 110(21), pp. 3458-3483. doi: 10.1016/j.neuron.2022.10.020.
- Park, J. *et al.* (2013) «SIRT5-Mediated Lysine Desuccinylation Impacts Diverse Metabolic Pathways», *Molecular Cell*, 50(6), pp. 919-930. doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.001.
- Park, J. M. *et al.* (2017) «Hyperpolarized Sodium [1-¹³C]-Glycerate as a Probe for Assessing Glycolysis in Vivo», *Journal of the American Chemical Society*, 139(19), pp. 6629-6634. doi: 10.1021/jacs.7b00708.
- Park, S. *et al.* (2023) «Lactate as a major epigenetic carbon source for histone acetylation via nuclear LDH metabolism», *Nature*, 10(august) . doi: 10.1038/s12276-023-01095-w.
- Parpura, V., Schousboe, A. y Verkhratsky, A. (2014) *Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain*, *Advances Neurobiology*. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-08894-5>.
- Pasteur, L. (1861) «Expériences et vues nouvelles sur la nature des fermentations», *C. R. Acad Sci*, 52, pp. 1260-1264.
- Patching, S. G. (2017) «Glucose Transporters at the Blood-Brain Barrier: Function, Regulation and Gateways for Drug Delivery», *Molecular Neurobiology*. *Molecular Neurobiology*, 54(2), pp. 1046-1077. doi: 10.1007/s12035-015-9672-6.
- Patel, A. B. *et al.* (2014) «Direct evidence for activity-dependent glucose phosphorylation in neurons with implications for the astrocyte-to-neuron lactate shuttle», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 111(14), pp. 5385-5390. doi: 10.1073/PNAS.1403576111.
- Pellerin, L. y Magistretti, P. J. (1994) «Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 91(22), pp. 10625-10629. doi: 10.1073/Proceedings of the National Academy of Sciences of US.91.22.10625.
- Perea, G., Navarrete, M. y Araque, A. (2009) «Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information», *Trends in Neurosciences*, 32(8), pp. 421-431. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.001.

- Pierre, K. y Pellerin, L. (2005) «Monocarboxylate transporters in the central nervous system: Distribution, regulation and function», *Journal of Neurochemistry*, 94(1), pp. 1-14. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x.
- Pilkis, S. *et al.* (1983) «Rat hepatic 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: A unique bifunctional enzyme», *Advances in Enzyme Regulation*, 21(C). doi: 10.1016/0065-2571(83)90013-4.
- Pilkis, S. J. *et al.* (1981) «Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate.», *Journal of Biological Chemistry*, 256(8), pp. 3619-3622. doi: 10.1016/s0021-9258(19)69494-9.
- Rardin, M. J. *et al.* (2013) «SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks», *Cell Metabolism*, 18(6), pp. 920-933. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.013.
- Rayasam, G. V. *et al.* (2009) «Glycogen synthase kinase 3: More than a namesake», *British Journal of Pharmacology*, 156(6), pp. 885-898. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00085.x.
- Rice, M. E. (2000) «Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain», *Trends in Neurosciences*, 23(5), pp. 209-216. doi: 10.1016/S0166-2236(99)01543-X.
- Rider, M. H. *et al.* (2004) «6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: Head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis», *Biochemical Journal*, 381(3), pp. 561-579. doi: 10.1042/BJ20040752.
- Rodriguez-Rodriguez, P. *et al.* (2012) «Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose-phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration», *Cell Death and Differentiation*, 19(10), pp. 1582-1589. doi: 10.1038/cdd.2012.33.
- Rodriguez-Rodriguez, P. (2013) *Mecanismos De Regulación De La Glucolisis En Neuronas Y Su Función En Supervivencia Celular*. Universidad de Salamanca. Disponible en: http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/123044/1/DBBM_Rodriguezrodriguez_mecanismosregulacionglucolisisneuronas (Tesis doctoral)
- Rodríguez-Saavedra, C. *et al.* (2021) «Moonlighting Proteins: The Case of the Hexokinases», *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(June), pp. 1-23. doi: 10.3389/fmolb.2021.701975.
- Ronald Zielke, H. *et al.* (2007) «Effect of fluorocitrate on cerebral oxidation of lactate and glucose in freely moving rats», *Journal of Neurochemistry*, 101(1), pp. 9-16. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04335.x.
- Ros, S. y Schulze, A. (2013) «Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism», *Cancer & Metabolism*, 1(1), pp. 1-10. doi: 10.1186/2049-3002-1-8.
- Rose, J. *et al.* (2020) «Mitochondrial Metabolism in Astrocytes Regulates Brain Bioenergetics, Neurotransmission and Redox Balance», *Frontiers in Neuroscience*, 14(November), pp. 1-20. doi: 10.3389/fnins.2020.536682.
- Rubio-Villena, C. *et al.* (2018) «Astrocytes: New players in progressive myoclonus epilepsy of Lafora type», *Human Molecular Genetics*, 27(7), pp. 1290-1300. doi: 10.1093/hmg/ddy044.
- Ruchti, E. *et al.* (2016) «Protein targeting to glycogen is a master regulator of glycogen synthesis in astrocytes», *IBRO Reports*, 1, pp. 46-53. doi: 10.1016/j.ibror.2016.10.002.

- Sakai, A. *et al.* (1996) «Cloning of cDNA encoding for a novel isozyme of fructose 6-Phosphate,2-Kinase/Fructose 2,6-bisphosphatase from human placenta», *Journal of Biochemistry*, 119(3), pp. 506-511. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021270.
- Sakai, D. *et al.* (2023) «Glycolytic activity is required for the onset of neural plate folding during neural tube closure in mouse embryos», *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11(July), pp. 1-11. doi: 10.3389/fcell.2023.1212375.
- San-Millán, I. *et al.* (2020) «Is Lactate an Oncometabolite? Evidence Supporting a Role for Lactate in the Regulation of Transcriptional Activity of Cancer-Related Genes in MCF7 Breast Cancer Cells», *Frontiers in Oncology*, 9(January), pp. 1-10. doi: 10.3389/fonc.2019.01536.
- Sayre, N. L. *et al.* (2017) «Stimulation of astrocyte fatty acid oxidation by thyroid hormone is protective against ischemic stroke-induced damage», *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(2), pp. 514-527. doi: 10.1177/0271678X16629153.
- Van Schaftingen, E., Davies, D. R. y Hers, H. -G (1982) «Fructose-2,6-bisphosphatase from Rat Liver», *European Journal of Biochemistry*, 124(1), pp. 143-149. doi: 10.1111/j.1432-1033.1982.tb05917.x.
- Van Schaftingen, E., Hue, L. y Hers, H. G. (1980) «Fructose 2,6-bisphosphate, the probable structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase», *Biochemical Journal*, 192(3), pp. 897-901. doi: 10.1042/bj1920897.
- Schägger, Hermann and Pfeiffer, K. (2000) «Schägger, Pfeiffer, Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria», *EMBO Journal*, 19(8), pp. 1777-1783.
- Schönfeld, P. y Reiser, G. (2017) «Brain energy metabolism spurns fatty acids as fuel due to their inherent mitotoxicity and potential capacity to unleash neurodegeneration», *Neurochemistry International*, 109, pp. 68-77. doi: 10.1016/j.neuint.2017.03.018.
- Schousboe, A. *et al.* (1997) «Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites», *Glia*, 21(1), pp. 99-105. doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(199709)21:1<99::AID-GLIA11>3.0.CO;2-W.
- Schousboe, A., Waagepetersen, H. S. y Sonnewald, U. (2019) «Astrocytic pyruvate carboxylation: Status after 35 years», *Journal of Neuroscience Research*, 97(8), pp. 890-896. doi: 10.1002/jnr.24402.
- Schurr, A., West, C. A. y Rigor, B. M. (1988) «Lactate-Supported Synaptic Function in the Rat Hippocampal Slice Preparation», *Science*, 240(24), pp. 5-7.
- Seibenhener, M. L. y Wooten, M. C. (2015) «Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice», *Journal of Visualized Experiments*, (96), pp. 1-6. doi: 10.3791/52434.
- Seo, M. y Lee, Y. H. (2014) «PFKFB3 regulates oxidative stress homeostasis via its S-glutathionylation in cancer», *Journal of Molecular Biology*, 426(4), pp. 830-842. doi: 10.1016/j.jmb.2013.11.021.
- Sickmann, H. M. *et al.* (2009) «Functional significance of brain glycogen in sustaining glutamatergic neurotransmission», *Journal of Neurochemistry*, 109(SUPPL. 1), pp. 80-86. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05915.x.

- Signal, M. *et al.* (2012) «Impact of retrospective calibration algorithms on hypoglycemia detection in newborn infants using continuous glucose monitoring», *Diabetes Technology and Therapeutics*, 14(10), pp. 883-890. doi: 10.1089/dia.2012.0111.
- Simpson, I. A., Carruthers, A. y Vannucci, S. J. (2007) «Supply and demand in cerebral energy metabolism: The role of nutrient transporters», *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(11), pp. 1766-1791. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600521.
- Singh, P. K. y Singh, S. (2015) «Changing shapes of glycogen-autophagy nexus in neurons: Perspective from a rare epilepsy», *Frontiers in Neurology*, 6(FEB), pp. 1-6. doi: 10.3389/fneur.2015.00014.
- Sinha, T. *et al.* (2020) «The Intersection of Serine Metabolism and Cellular», *Cells MPDI* pp. 1-13. doi.org/10.3390/cells9030674
- Sola-Penna, M. *et al.* (2010) «Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism», *IUBMB Life*, 62(11), pp. 791-796. doi: 10.1002/iub.393.
- Sonnenwald, U. *et al.* (1991) «First direct demonstration of preferential release of citrate from astrocytes using [13C]NMR spectroscopy of cultured neurons and astrocytes», *Neuroscience Letters*, 128(2), pp. 235-239. doi: 10.1016/0304-3940(91)90268-X.
- Sorg, O. *et al.* (1995) «Adenosine triphosphate and arachidonic acid stimulate glycogenolysis in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes», *Neuroscience Letters*, 188(2), pp. 109-112. doi: 10.1016/0304-3940(95)11410-X.
- Sosunov, A. A. *et al.* (2014) «Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain», *Journal of Neuroscience*, 34(6), pp. 2285-2298. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4037-13.2014.
- Sotelo-Hitschfeld, T. *et al.* (2015) «Channel-mediated lactate release by K⁺-stimulated astrocytes», *Journal of Neuroscience*, 35(10), pp. 4168-4178. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5036-14.2015.
- Sotelo-Hitschfeld, T., Fernández-Moncada, I. y Barros, L. F. (2012) «Acute feedback control of astrocytic glycolysis by lactate», *Glia*, 60(4), pp. 674-680. doi: 10.1002/glia.22304.
- Souza, D. G. *et al.* (2019) «The astrocyte biochemistry», *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 95(November 2018), pp. 142-150. doi: 10.1016/j.semcd.2019.04.002.
- Stelfa, G. *et al.* (2021) «Reduced GFAP expression in bergmann glial cells in the cerebellum of sigma-1 receptor knockout mice determines the neurobehavioral outcomes after traumatic brain injury», *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), pp. 1-18. doi: 10.3390/ijms222111611.
- Su, Y. *et al.* (2003) «The α -subunit of the V-type H⁺-ATPase interacts with phosphofructokinase-1 in humans», *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), pp. 20013-20018. doi: 10.1074/jbc.M210077200.
- Sung, K. y Jimenez-Sanchez, M. (2020) «Autophagy in Astrocytes and its Implications in Neurodegeneration», *Journal of Molecular Biology*, 432(8), pp. 2605-2621. doi: 10.1016/j.jmb.2019.12.041.

- Suzuki, A. *et al.* (2011) «Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation», *Cell*. Elsevier Inc., 144(5), pp. 810-823. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.018.
- Swanson, R. A. y Choi, D. W. (1993) «Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation in vitro», *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13(1), pp. 162-169. doi: 10.1038/jcbfm.1993.19.
- Tabata, H. (2015) «Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis», *Frontiers in Neuroscience*, 9(april), pp. 1-7. doi: 10.3389/fnins.2015.00114.
- Tarantini, S. *et al.* (2019) «Age-Related Alterations in Gait Function in Freely Moving Male C57BL/6 Mice: Translational Relevance of Decreased Cadence and Increased Gait Variability», *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 74(9), pp. 1417-1421. doi: 10.1093/gerona/gly242.
- Tauffenberger, A. *et al.* (2019) «Lactate and pyruvate promote oxidative stress resistance through hormetic ROS signaling», *Cell Death and Disease*, 10(9). doi: 10.1038/s41419-019-1877-6.
- Tsacopoulos, M. *et al.* (1994) «Glial cells transform glucose to alanine, which fuels the neurons in the honeybee retina», *Journal of Neuroscience*, 14(3 I), pp. 1339-1351. doi: 10.1523/jneurosci.14-03-01339.1994.
- Uyeda, K., Furuya, E. y Luby, L. J. (1981) «The effect of natural and synthetic D-fructose 2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinases», *Journal of Biological Chemistry*, 256(16), pp. 8394-8399. doi: 10.1016/s0021-9258(19)68856-3.
- Vardjan, N. *et al.* (2018) «Enhancement of astroglial aerobic glycolysis by extracellular lactate-mediated increase in cAMP», *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(May), pp. 1-15. doi: 10.3389/fnmol.2018.00148.
- Vercellino, I. y Sazanov, L. A. (2022) «The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(2), pp. 141-161. doi: 10.1038/s41580-021-00415-0.
- Viana, J. F. *et al.* (2023) «Astrocyte structural heterogeneity in the mouse hippocampus», *Glia*, 71(7), pp. 1667-1682. doi: 10.1002/glia.24362.
- Vicente-Gutierrez, C. *et al.* (2019) «Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour», *Nature Metabolism*, 1(2), pp. 201-211. doi: 10.1038/s42255-018-0031-6.
- Vilchez, D. *et al.* (2007) «Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy», *Nature Neuroscience*, 10(11), pp. 1407-1413. doi: 10.1038/nn1998.
- Volkenhoff, A. *et al.* (2015) «Glial glycolysis is essential for neuronal survival in drosophila», *Cell Metabolism*, 22(3), pp. 437-447. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.006.
- Walls, A. B. *et al.* (2008) «Characterization of 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB) as an inhibitor of brain glycogen shunt activity», *Journal of Neurochemistry*, 105(4), pp. 1462-1470. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05250.x.

- Walls, A. B. *et al.* (2009) «Robust glycogen shunt activity in astrocytes: Effects of glutamatergic and adrenergic agents», *Neuroscience*, IBRO, 158(1), pp. 284-292. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.09.058.
- Wang, H. *et al.* (2022) «Nuclear TIGAR mediates an epigenetic and metabolic autoregulatory loop via NRF2 in cancer therapeutic resistance», *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(4), pp. 1871-1884. doi: 10.1016/j.apsb.2021.10.015.
- Wang, M. M. *et al.* (2019) «The relationship between autophagy and brain plasticity in neurological diseases», *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(May), pp. 1-8. doi: 10.3389/fncel.2019.00228.
- Warburg, O. (1925) «The metabolism of carcinoma cells 1», *The Journal of Cancer Research*, 9(1), pp. 148-163. doi: 10.1158/jcr.1925.148.
- Weber, B. y Barros, L. F. (2015) «The astrocyte: Powerhouse and recycling center», *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12), pp. 1-15. doi: 10.1101/cshperspect.a020396.
- Wei, Y. *et al.* (2020) «Pyridoxine induces glutathione synthesis via PKM2-mediated Nrf2 transactivation and confers neuroprotection», *Nature Communications*, 11(1). doi: 10.1038/s41467-020-14788-x.
- Weissert, V. *et al.* (2021) «Inhibition of the mitochondrial ATPase function by IF1 changes the spatiotemporal organization of ATP synthase», *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1862(1), p. 148322. doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148322.
- Westergaard, N. *et al.* (2017) «Citrate, a Ubiquitous Key Metabolite with Regulatory Function in the CNS», *Neurochemical Research*, 42(6), pp. 1583-1588. doi: 10.1007/s11064-016-2159-7.
- Wieder, C. *et al.* (2021) «Pathway analysis in metabolomics: Recommendations for the use of over-representation analysis», *PLoS Computational Biology*, 17(9), pp. 1-23. doi: 10.1371/journal.pcbi.1009105.
- Wilhelmsson, U. *et al.* (2006) «Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 103(46), pp. 17513-17518. doi: 10.1073/PNAS.0602841103.
- Wilson, J. E. (2003) «Isozymes of mammalian hexokinase: Structure, subcellular localization and metabolic function», *Journal of Experimental Biology*, 206(12), pp. 2049-2057. doi: 10.1242/jeb.00241.
- Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M. y Kettenmann, H. (2017) «Microglia in Physiology and Disease», *Annual Review of Physiology*, 79, pp. 619-643. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034406.
- Wu, K. *et al.* (1997) «The synthesis of ATP by glycolytic enzymes in the postsynaptic density and the effect of endogenously generated nitric oxide», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 94(24), pp. 13273-13278. doi: 10.1073/PNAS.94.24.13273.
- Wu, S. *et al.* (2021) «SIRT5 Represses Neurotrophic Pathways and A β Production in Alzheimer's Disease by Targeting Autophagy», *ACS Chemical Neuroscience*, 12(23), pp. 4428-4437. doi: 10.1021/acscchemneuro.1c00468.

- Xiao, Y. *et al.* (2021) «Inhibition of PFKFB3 induces cell death and synergistically enhances chemosensitivity in endometrial cancer», *Oncogene*, 40(8), pp. 1409-1424. doi: 10.1038/s41388-020-01621-4.
- Xiong, X. Y., Tang, Y. y Yang, Q. W. (2022) «Metabolic changes favor the activity and heterogeneity of reactive astrocytes», *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 33(6), pp. 390-400. doi: 10.1016/j.tem.2022.03.001.
- Xu, J. *et al.* (2011) «The Molecular Mechanism Underlying Morphine-Induced Akt Activation: Roles of Protein Phosphatases and Reactive Oxygen Species», *Cell Biochemistry and Biophysics*, 61(2), pp. 303-311. doi: 10.1007/s12013-011-9213-5.
- Xu, Y. *et al.* (2014) «Endothelial PFKFB3 plays a critical role in angiogenesis», *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(6), pp. 1231-1239. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.303041.
- Yalcin, A. *et al.* (2009) «Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases», *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), pp. 24223-24232. doi: 10.1074/jbc.M109.016816.
- Yamamoto, T. *et al.* (2014) «Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway», *Nature Communications*, 5, pp. 1-16. doi: 10.1038/ncomms4480.
- Yan, T. *et al.* (2017) «Antidepressant-like effects and cognitive enhancement of Schisandra chinensis in chronic unpredictable mild stress mice and its related mechanism», *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1-15. doi: 10.1038/s41598-017-07407-1.
- Yang, M. y Vousden, K. H. (2016) «Serine and one-carbon metabolism in cancer», *Nature Reviews Cancer*, 16(10), pp. 650-662. doi: 10.1038/nrc.2016.81.
- Yang, Z., Goronzy, J. J. y Weyand, C. M. (2014) «The glycolytic enzyme PFKFB3/phosphofructokinase regulates autophagy», *Autophagy*, 10(2), pp. 382-383. doi: 10.4161/auto.27345.
- Yao, S. *et al.* (2023) «Astrocytic lactate dehydrogenase A regulates neuronal excitability and depressive-like behaviors through lactate homeostasis in mice», *Nature Communications*, 14(1), pp. 1-18. doi: 10.1038/s41467-023-36209-5.
- Yardeni, T. *et al.* (2011) «Retro-orbital injections in mice», *Lab Animal*, 40(5), pp. 155-160. doi: 10.1038/labon0511-155.
- Ye, J. *et al.* (2012) «Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation», *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*, 109(18), pp. 6904-6909. doi: 10.1073/PNAS.1204176109.
- Yuan, M. *et al.* (2018) «An allostatic mechanism for M2 pyruvate kinase as an amino-acid sensor», *Biochemical Journal*, 475(10), pp. 1821-1837. doi: 10.1042/BCJ20180171.
- Zancan, P. *et al.* (2007) «Fructose-2,6-bisphosphate counteracts guanidinium chloride-, thermal-, and ATP-induced dissociation of skeletal muscle key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase: A structural mechanism for PFK allosteric regulation», *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 467(2), pp. 275-282. doi: 10.1016/j.abb.2007.08.032.

- Zancan, P. *et al.* (2010) «Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells», *Molecular Genetics and Metabolism*, 100(4), pp. 372-378. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.04.006.
- Zhang, D. *et al.* (2019) «Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation», *Nature*, 574(7779), pp. 575-580. doi: 10.1038/s41586-019-1678-1.
- Zhang, Y. *et al.* (2016) «Inhibition of Lactate Transport Erases Drug Memory and Prevents Drug Relapse», *Biological Psychiatry*, 79(11), pp. 928-939. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.07.007.
- Zhang, Z. *et al.* (2019) «The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions», *BioMed Research International*, Article ID 9605265. doi: 10.1155/2019/9605265.
- Zheng, J. (2012) «Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation», *Oncology Letters*, 4(6), pp. 1151-1157. doi: 10.3892/ol.2012.928.
- Zheng, J. *et al.* (2021) «GLP-1 improves the supportive ability of astrocytes to neurons by promoting aerobic glycolysis in Alzheimer's disease», *Molecular Metabolism*, 47(February), pp. 1-14. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101180.

