A fluorescence microscopy image of a brain slice. The image shows a complex network of structures, likely representing the brain's vasculature and cellular components. The colors are primarily blue and orange, with some green and red highlights. The background is dark, making the illuminated structures stand out. The overall appearance is that of a detailed biological specimen under a microscope.

Las especies reactivas de oxígeno mitocondriales
de los astrocitos regulan el metabolismo
cerebral y el comportamiento en ratón.

Carlos Vicente Gutiérrez
Universidad de Salamanca
Mayo 2019

Universidad de Salamanca

INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA

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

La presentación de la tesis doctoral titulada **“Las especies reactivas de oxígeno mitocondrial de los astrocitos regulan el metabolismo cerebral y el comportamiento en ratón”** que ha sido realizada bajo su dirección por el Graduado en Biotecnología (Universidad de Salamanca), *Carlos Vicente Gutiérrez*, en el centro mixto Universidad de Salamanca-CSIC Instituto de Biología Funcional y Genómica.

Además, *Carlos Vicente Gutiérrez* presenta las condiciones para solicitar la mención de ‘Doctor Internacional’, tras haber completado una estancia de investigación de 3 meses en el Neurocentro Magendie de Burdeos. Por ello, el depósito de este trabajo se acompaña de la documentación que certifica dicha estancia, junto con 2 informes favorables de expertos doctores internacionales que certifican la calidad científica del apartado “resumen en inglés” incluido en este trabajo.

Salamanca, a 30 de abril de 2019.

Índice

Abreviaturas	9
Sinopsis	9
Introducción	13
1. Interés biomédico de la investigación básica y aplicada del sistema nervioso central.	15
2. Tipos celulares en el sistema nervioso central: compartimentación y especialización.	15
2.1. <i>La indispensable colaboración entre las células gliales y nerviosas.</i>	17
3. Metabolismo energético del cerebro: glucosa, oxígeno y la cooperación astrocito-neurona. .	18
3.1. <i>Acoplamiento del metabolismo glucolítico de astrocitos y neuronas.</i>	18
3.1.1. <i>Lanzadera de lactato entre astrocitos y neuronas.</i>	19
3.2. <i>Acoplamiento del metabolismo y la neurotransmisión en la cooperación astrocito-neurona.</i>	21
3.3. <i>Aspectos del metabolismo oxidativo comparado entre astrocitos y neuronas.</i>	22
3.3.1. <i>Supercomplejos mitocondriales: transporte de electrones y producción de especies reactivas de oxígeno.</i>	23
3.3.2. <i>Diferencias en la configuración de supercomplejos mitocondriales en astrocitos y neuronas.</i>	24
4. Especies reactivas de oxígeno.	25
4.1. <i>Fuentes celulares de ROS.</i>	25
4.2. <i>Defensa antioxidante celular.</i>	29
5. Relevancia fisiopatológica de los ROS.	30
5.1. <i>Implicación de los ROS en enfermedad.</i>	31
5.2. <i>Papel señalizador de los ROS: cascadas de señalización y factores de transcripción.</i>	32
5.3. <i>Señalización redox en el sistema nervioso central.</i>	34
6. Modelos animales para combatir y estudiar los efectos de los ROS.	35
Hipótesis y objetivos	39
Materiales y métodos	45
1. Protocolos de trabajo con modelos de ratón modificados genéticamente	47
1.1. <i>Generación del modelo de ratón knock-in mitoCatalasa (mCAT).</i>	47
1.1.1. <i>Diseño de cruces para la obtención de modelos mCAT de interés.</i>	48
2. Genotipado de ratones mCAT.	50
2.1. <i>Extracción de ADN genómico de biopsias de cola de ratón.</i>	50
2.2. <i>Protocolos de identificación genotípica de los ratones mCAT.</i>	50
2.2.1. <i>Detección del alelo mCat en animales constitutivos y condicionales. Análisis del evento de recombinación en modelos condicionales.</i>	50
2.2.2. <i>Detección de la construcción Cre-recombinasa.</i>	51
2.2.3. <i>Detección de la mutación Nnt.</i>	52

3.	Cultivos celulares primarios.....	52
3.1.	<i>Tratamientos, inhibición de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial.....</i>	<i>52</i>
3.2.	<i>Protocolo de cultivo primario de astrocitos de ratón, de neonatos individualizados.....</i>	<i>53</i>
3.3.	<i>Protocolo de cultivo primario de neuronas corticales de ratón.....</i>	<i>54</i>
3.4.	<i>Protocolo de co-cultivo de astrocitos y neuronas corticales.....</i>	<i>54</i>
4.	Protocolos para la separación y estudio de astrocitos y neuronas de cerebros de ratón adulto.	54
4.1.	<i>Separación de poblaciones adultas mediante citometría de flujo tras la inyección de AAVs-GFP célula específicos.....</i>	<i>54</i>
5.	Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS).	57
5.1.	<i>Detección de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) mediante Amplex Red®.....</i>	<i>57</i>
5.2.	<i>Determinación in vitro de H₂O₂ como medida de la actividad enzimática de la catalasa.....</i>	<i>58</i>
5.3.	<i>Detección de anión superóxido (O₂⁻) mediante MitoSox™.....</i>	<i>59</i>
6.	Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante MitoProbe™ DiIC₁(5).	60
7.	Determinación de daño oxidativo al ADN.....	62
8.	Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas específicas.....	62
8.1.	<i>Electroforesis desnaturizante y transferencia tipo Western blot.</i>	<i>62</i>
8.2.	<i>Electroforesis en condiciones nativas.</i>	<i>63</i>
9.	Determinación de la actividad del complejo I de la cadena de transporte mitocondrial.	63
9.1.	<i>Medida de actividad en gel nativo.....</i>	<i>63</i>
9.2.	<i>Medida espectrofotométrica de la actividad específica del complejo I.....</i>	<i>64</i>
10.	Análisis de proliferación celular por incorporación de Bromo-deoxiuridina (BrdU).	64
11.	Determinación de la apoptosis celular.	65
11.1.	<i>Protocolo Anexina V-7-AAD.....</i>	<i>65</i>
11.2.	<i>Protocolo de la actividad de caspasa-3 activa.....</i>	<i>66</i>
12.	Determinación de la masa mitocondrial.....	66
12.1.	<i>Copias de ADN mitocondrial (ADNmt).....</i>	<i>67</i>
12.2.	<i>Masa mitocondrial.....</i>	<i>67</i>
13.	Determinación del flujo glucolítico.	68
14.	Evaluación ex vivo del flujo glucolítico en cerebro de ratón.	68
15.	Determinación del flujo de la vía de las pentosas fosfato.....	69
16.	Determinación enzimática de lactato extracelular.....	69
17.	Determinación enzimática de glucosa extracelular.	70
18.	Determinación enzimática de fructosa extracelular.	70
19.	Determinación de los niveles de ATP intracelular.	71
20.	Determinación del consumo de oxígeno celular.	71

21. Análisis transcriptómico de astrocitos y neuronas aisladas de cerebro de ratón adulto mediante microarrays de expresión.	72
22. Análisis metabolómico en muestras de cerebro de ratón adulto.	73
23. Perfusión de los animales y análisis inmunohistoquímico.	74
24. Anticuerpos.	75
25. Análisis del comportamiento espontáneo del ratón.	76
25.1. <i>Coordinación motora evaluada en Rotarod.</i>	76
25.2. <i>Evaluación de la exploración en campo abierto.</i>	77
25.3. <i>Evaluación de la memoria en el reconocimiento de nuevos objetos.</i>	77
26. Modelo de daño oxidativo cerebral; tratamiento con ácido 3-nitropropiónico.	78
27. Software y análisis estadístico de los datos.	79

Resultados..... 81

1. Estrategia mitoCatalasa (mCAT). Desarrollo de un nuevo modelo de ratón para el estudio de la señalización redox astrocítica en el cerebro.	83
2. La expresión de mitoCatalasa es un sistema eficiente para la correcta reducción de los niveles endógenos de mROS en astrocitos <i>in vitro</i>.	84
3. La disminución de mROS en los astrocitos mCAT no induce daños drásticos en la biología celular de estos astrocitos.	87
4. La disminución de mROS en los astrocitos mCAT es suficiente para modular diversos aspectos de la configuración metabólica característica de los astrocitos primarios y la homeostasis neuronal.	89
4.1. <i>Influencia de la señalización redox astrocítica en la biología mitocondrial de los astrocitos: Configuración de la CTE, funcionalidad y carga mitocondrial.</i>	89
4.2. <i>Influencia de la señalización redox astrocítica en el metabolismo glucídico de los astrocitos.</i>	92
4.3. <i>Influencia de la señalización redox astrocítica en la colaboración astrocito-neurona.</i>	93
5. Estrategia mitoCatalasa <i>in vivo</i>: El modelo mCAT condicional permite un control espacio-temporal de la reducción de los niveles endógenos de mROS <i>in vivo</i>.	94
5.1. <i>El modelo GFAP-mCAT expresa mCAT exclusivamente en cerebro y específicamente en el compartimento astrocítico.</i>	95
5.2. <i>El modelo GFAP-mCAT reduce eficientemente los niveles de mROS en el compartimento astrocítico.</i>	97
6. Influencia <i>in vivo</i> de la señalización redox astrocítica en el programa de expresión génica de astrocitos y neuronas.	98
6.1. <i>Modulación mROS astrocíticos en la expresión de genes neuronales.</i>	98
6.2. <i>Modulación mROS astrocíticos en la expresión de genes astrocíticos.</i>	99
7. Influencia <i>in vivo</i> de la señalización redox astrocítica en el metabolismo cerebral.	103
8. Influencia <i>in vivo</i> de la señalización redox astrocítica en la histología cerebral.	106
9. Influencia <i>in vivo</i> de la señalización redox cerebral de astrocitos y neuronas en el comportamiento del ratón.	109
10. La señalización redox cerebral tiene un contexto celular.	112

Discusión y perspectivas	115
1. La relevancia del fondo genético para la reproducibilidad de resultados.	117
2. Consideraciones del estudio de los ROS. Eficacia del modelo mCAT para el estudio de la señalización redox <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	117
3. Mecanismos de señalización redox astrocítica.	119
3.1. Factores de transcripción.....	119
3.2. Análisis inferencial: proteínas sensibles al estado redox.	120
4. Biología redox astrocítica y metabolismo cerebral.....	121
4.1. Reprogramación metabólica cerebral modulada por los mROS astrocíticos.	122
5. Revisión del metabolismo mitocondrial astrocítico.	123
6. Fracaso de la terapia antioxidante, nuevas consideraciones para el éxito de su traslación...	124
7. El papel del astrocito en funciones cognitivas y fisiopatología cerebral.	125
8. Perspectivas futuras y utilidades del modelo mCAT.....	127
Conclusiones.....	129
Resumen en inglés/ Thesis English summary	133
Referencias bibliográficas	161

Abreviaturas

7-AAD: 7-amino-actinomicina D
ADN mt o ADN n: ADN mitocondrial o nuclear
ANOVA: Análisis de la Varianza
APC: Alofococianina
ARE: Elemento de Respuesta a Antioxidantes
ATP: Adenosina trifosfato
BCA: Ácido Bicinconínico
BDNF: Factor Neurotrófico derivado del cerebro
BSA: Albúmina sérica bovina
CAMKII: Proteína quinasa II dependiente de Ca²⁺- Calmodulina
CCCP: Carbonil cianuro 3- clorofenilhidrazona
cDNA: DNA codificante
CMV: citomegalovirus
CREB: *cAMP response element binding protein*
Ct: Ciclo umbral
CUL3: Culina-3
CysGly: Cisteinilglicina
DAG: Diacilglicerol
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DiIc₁: 1,1', 3, 3', 3', 3' - hexametilindodicarbo - yoduro de cianina
DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: Dimetil Sulfóxido
DNA o ADN: Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTNB: 5,5'-ditio-bis-acido 2-nitrobenzoico
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético
EGTA: Ácido Etilenglicoltetraacético
ER: Receptor de estrógenos
ERT2: Receptor de estrógenos sensible a tamosifeno
GCL: Glutamato-cisteína ligasa
GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*
GFP: Proteína Verde Fluorescente
GPxs: Glutación Peroxidasas
Grxs: Glutarredoxinas
GSH: Glutación reducido
GSR: Glutación Reductasa
GSS: Glutación Sintetasa
GSSG: Glutación oxidado (disulfuro de glutación)
GSSX: Disulfuro de glutación con xenobióticos u otros compuestos
GSTs: Glutación-S-Transferasas
GSx: Glutación total
H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno
HA: hemaglutinina
HBSS o HANK's: (Hank's Balanced Salt Solution
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico

HRP: Peroxidasa de Rábano
HSP: del inglés, heat shock protein
KEAP1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*
 K_m : Constante de Michaelis-Menten
KRPG: Krebs Ringer Phosphate Glucose Buffer
LoxP: locus of X-over P1, sitio de reconocimiento Cre recombinasa
MAP2: *Microtubule-Associated Protein 2*
MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
mCAT/mCat: mitocatalasa (proteína/gen)
mRNA: RNA mensajero
NAD⁺: Nucleótido de nicotinamida y adenina (oxidado).
NADH(H⁺): Nucleótido de nicotinamida y adenina (reducido)
NADP⁺: Nucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (oxidado)
NADPH(H⁺): Nucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (reducido)
NFκ-B: Factor de transcripción nuclear kappa-B
NMDA: Ácido N-metil-D-aspartato
NMDAR: Receptores de ácido N-metil-D-aspartato
NO: Óxido nítrico
NRF2 o NFE2L2: *Nuclear factor erythroid-derived 2 - like 2*
OPA1: *Optic atrophy type 1 protein*
PBS: Tampón fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PEI: Polietilenimina
Prxs: Peroxirredoxinas
PTP: Poro de transición de permeabilidad
PVDF: fluoruro de polivinilideno
qPCR: PCR cuantitativa o PCR a tiempo real
RE: retículo endoplasmático
RIPA: del inglés, radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA o ARN: Ácido Ribonucleico
RNS: Especies Reactivas de Nitrógeno
ROS: Especies Reactivas de Oxígeno
S.E.M.: Error estándar de la media
SDS: Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SNC: Sistema Nervioso Central
SOD1 o Cu/ZnSOD: Superóxido Dismutasa 1 o Cu/Zn-superóxido dismutasa
SOD2 o MnSOD: Superóxido Dismutasa 2 o Mn-superóxido dismutasa
Trx: Tiorredoxinas
TrxR: Tiorredoxina Reductasa
Ub: Ubiquitina
WT: del inglés, wild type en referencia a genotipos silvestres

Sinopsis

La conservación de la energía cerebral requiere la cooperación entre los tipos de células metabólicamente distantes; las neuronas y los astrocitos. Las neuronas, que dependen en gran medida de la fosforilación oxidativa mitocondrial para su función y supervivencia, utilizan sustratos fácilmente oxidables, algunos suministrados por los astrocitos, que son más glucolíticos. Así, la cadena respiratoria mitocondrial está estrechamente organizada y es eficiente en las neuronas, pero está poco ensamblada y es menos eficiente en los astrocitos. Como consecuencia, la generación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ROS) es mucho menor en las neuronas que en los astrocitos. Sin embargo, se desconoce si los abundantes niveles de ROS mitocondriales (mROS) en los astrocitos desempeñan alguna función fisiológica. En esta tesis nos propusimos investigar esta posibilidad.

Para abordar este problema, hemos generado un ratón que sobreexpresa una versión mitocondrial de la enzima catalasa (mitoCatalasa, mCAT) con la idea de disminuir persistentemente los niveles de mROS en los astrocitos durante la edad adulta. Comprobamos la eficiencia *in vitro* e *in vivo* de la reducción de mROS astrocíticos. Posteriormente, los resultados de transcriptómica, metabolómica, flujos metabólicos, junto con la inmunohistoquímica y el escrutinio del comportamiento de estos ratones revelaron alteraciones significativas a nivel cerebral en diversas vías metabólicas y modificaciones estructurales a nivel neuronal, compatibles con los leves defectos cognitivos observados. En concreto, los datos revelan que los mROS astrocíticos regulan, al menos, la utilización de la glucosa a través de la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato (PPP). Este proceso es esencial para asegurar el apoyo metabólico que los astrocitos ejercen sobre las neuronas. Por tanto, nuestro trabajo demuestra que los mROS endógenos astrocíticos tienen una relevancia funcional que garantiza la correcta cooperación metabólica entre astrocitos y neuronas, necesaria para la bioenergética y supervivencia neuronal. Por último, este nuevo modelo animal podría ser una estrategia útil también como herramienta para combatir el estrés oxidativo en modelos de enfermedades neurológicas y estudiar aspectos celulares de este tipo de estrés.

En resumen, nuestro trabajo revela propiedades de la señalización redox y su relación con la coordinación del metabolismo en el sistema nervioso central (SNC). También, pone de manifiesto la relevancia de los astrocitos en la regulación de funciones superiores del SNC como la conducta animal. Así, el estudio de la señalización redox requiere distinguir el origen celular de los ROS y explorar la función fisiológica como medio para comprender la intervención patológica. Por tanto, en nuestra opinión, este trabajo contribuye a la consideración de nuevos factores que deberán tenerse en cuenta en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso de sistemas antioxidantes.

Introducción

1. Interés biomédico de la investigación básica y aplicada del sistema nervioso central.

La investigación del sistema nervioso central (SNC) constituye un área de interés en auge, debido a que el aumento de la esperanza de vida y el envejecimiento poblacional han aumentado la prevalencia de los trastornos neurodegenerativos (Feigin et al. 2017). Precisamente, el envejecimiento es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Se incluyen entre ellas la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y otras demencias como la corea de Huntington, esclerosis múltiple, migraña, accidente cerebrovascular que origina ictus hemorrágicos o isquémicos, entre otros síndromes. Actualmente, estos trastornos neurológicos de etiología diversa son la principal fuente de discapacidad a nivel mundial. La ausencia de tratamientos eficaces, junto con el envejecimiento y crecimiento poblacional, hacen de la investigación del SNC uno de los objetivos principales de la sociedad científica (Feigin et al. 2017; GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators et al. 2018).

Como en cualquier área biomédica, la investigación del SNC puede abordarse desde un gran número de perspectivas: epidemiológica, farmacológica, biológica, bioquímica, entre otras. Desde el punto de vista bioquímico, la actividad cerebral requiere una alta demanda energética. Esto hace necesario la adaptación y colaboración de todos sus componentes celulares, para hacer frente a dicha elevada tasa metabólica. En el cerebro de los animales, a la diversidad celular debemos añadir una compleja evolución de la estructura anatómica del cerebro de los animales. Por último, cabe mencionar que la complejidad cerebral es aún mayor si se analizan subpoblaciones de cada tipo celular a lo largo del cerebro (DeFelipe et al. 2013; Kimelberg 2009; Miller 2018; Okuda 2018; Zegenhagen et al. 2016), dentro de una misma estructura cerebral (Mallory and Giocomo 2018) o dependiendo del micro-ambiente (Wilems et al. 2019). Todos estos aspectos convierten la investigación del SNC en una de las áreas más arduas e interesantes de la investigación biomédica.

2. Tipos celulares en el sistema nervioso central: compartimentación y especialización.

Para poder comprender la fisiología del cerebro es necesario conocer los componentes celulares que forman parte de este tejido. En el SNC, las neuronas son el tipo celular más representativo debido a sus propiedades biofísicas únicas que les permiten realizar una señalización electroquímica con la que modular el procesamiento, la propagación y la transmisión de información. Esta actividad neuronal requiere un gasto energético elevado, que ha exigido compensaciones entre el procesamiento de la información y el consumo de energía en la evolución de los circuitos neuronales. La mayor eficiencia energética de estos circuitos reducirá la demanda de la energía disponible para el cerebro, esto requiere un control que afecta desde el número y tipo de componentes moleculares que expresan, hasta la composición y longitud de los tractos axonales que unen a las neuronas (Niven 2016). Esta evolución y desarrollo ha promovido la diversidad y especialización de subpoblaciones neuronales, así como una distribución de tareas entre el resto de los componentes celulares.

Por otro lado, todos aquellos tipos celulares que carecen de las propiedades eléctricas de las neuronas, y que se agrupan en el término común de glía o neuroglia, también son objeto de la investigación del SNC. El principio fundamental que subyace en la fisiología cerebral es que la electricidad es esencial para transmitir la información. Por tanto, esta característica única de las neuronas relegó históricamente a la glía a un papel pasivo. Precisamente, el origen etimológico del término glía, derivado

de la palabra griega que significa pegamento, refleja la visión del siglo XIX. Durante esta época surgieron un gran número de teorías que aún hoy constituyen las bases de gran parte de la investigación biomédica. Por ejemplo, durante esta época se acuñó la primera definición de patología celular. Rudolph Virchow indicaba que cada enfermedad se origina a partir de las alteraciones que afectan a un número mayor o menor de unidades celulares dentro del organismo vivo y, por tanto, la tan buscada esencia de la enfermedad es la célula alterada (Ribatti 2018). Su visión de la glía era que estas células tenían la función de mantener unido el sistema nervioso. Sin embargo, desde finales del siglo XIX y principios del XX, las teorías paralelas de Ramón y Cajal y Camillo Golgi proponían conceptos pioneros sobre la relevancia de las células gliales en la función cerebral. El estudio de la arquitectura astrocítica permitió afirmar a Ramón y Cajal que “la neuroglia abunda donde las conexiones intercelulares son numerosas y complicadas, y no por el hecho de existir contactos, sino con la mira de reglarlos y dirigirlos de manera que cada expansión protoplásmica solo se ponga en relación íntima con un grupo especial de ramificaciones nerviosas terminales” (Navarrete et al. 2014). Estas teorías racionales no dejaban escapar la posición privilegiada de los astrocitos en el SNC. No obstante, fue necesario casi un siglo de avance técnico para demostrar el acierto de gran parte de las hipótesis planteadas, que demuestran que los astrocitos desempeñan funciones en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica y flujo sanguíneo cerebral, soporte estructural y metabólico esenciales la supervivencia neuronal (Weber and L. Felipe Barros 2015). Por supuesto, otro de los papeles fundamentales de los astrocitos es la síntesis y almacenamiento de gliotransmisores de diversa naturaleza: (i) aminoácidos, como el glutamato y la D-serina; (ii) nucleótidos, como la adenosina 5'-trifosfato; y (iii) péptidos, como el péptido natriurético auricular o el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés, *brain-derived neurotrophic factor*). Mediante este apoyo trófico a las neuronas dirigen la regulación de la guía axonal y la sinaptogénesis (Allaman, Bélanger, and Magistretti 2011; Weber and L. Felipe Barros 2015). También se encargan del reciclaje de neurotransmisores de la hendidura sináptica después de la excitación neuronal y del apoyo redox neuronal (Bolaños 2016). Por tanto, la visión actual de los astrocitos asume diversos aspectos de la fisiología de este tipo celular y su capacidad para comunicarse con las neuronas y otras células dentro del SNC mediante excitosis regulada.

Paralelamente, la percepción del resto de componentes de la neuroglia también ha cambiado. Los oligodendrocitos comparten un origen neuroectodérmico común con los astrocitos. La publicación de la “tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía” por Río Hortega (1928) definió que la formación y sostén de las vainas de mielina dependen de los oligodendrocitos. Actualmente, se conoce que la vaina de mielina se compone de la superposición de varias capas de membrana plasmática de los oligodendrocitos o de las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP) (Domingues et al. 2016). De esta manera, estas células rodean a los axones neuronales proporcionándoles un aislamiento eléctrico que les permite un transporte rápido del impulso nervioso. Sin embargo, actualmente se comprende que además proporcionan apoyo metabólico axonal y contribuyen a la neuroplasticidad (Domingues et al. 2016). Por último, la microglía tiene su origen en las células madre hematopoyéticas del saco vitelino que durante la embriogénesis temprana pueblan el sistema nervioso. Así, constituyen las principales células inmunitarias innatas cerebrales. Como ocurre con los macrófagos del resto de sistema inmune, la microglía mantiene su capacidad proliferativa y de autorrenovación con las que desempeña un papel esencial en procesos fisiopatológicos. Aunque su función en condiciones basales requiere un mayor estudio, su proliferación se asocia como una respuesta

de contención ante procesos inflamatorios o ciertas condiciones patológicas (Barros, Brown, and Swanson 2018; García-Cáceres et al. 2018).

2.1. La indispensable colaboración entre las células gliales y nerviosas.

Uno de los principales motivos de la riqueza de tipos celulares, es una consecuencia adaptativa a la evolución de la barrera hematoencefálica en el SNC de los animales. Esta barrera física supone una mayor protección, pero a su vez representa un aislamiento con respecto al resto del organismo. Esto exige autonomía que puede interpretarse como una desventaja importante, ya que reacciones químicas complejas y energéticamente costosas deben realizarse internamente (Weber and L. Felipe Barros 2015). Por eso la diversidad de tipos celulares en el SNC es intrínseca al requerimiento de una división de trabajo que garantice la especialización celular. Por lo tanto, la homeostasis cerebral se ha conseguido con la compartimentación de funciones en distintos tipos celulares. Pero es imprescindible, para garantizar el correcto funcionamiento del cerebro, que existan mecanismos que coordinen colaboraciones estrechas entre los diversos tipos celulares que lo componen. Por ejemplo, las neuronas son deficientes en varias vías metabólicas, que son proporcionalmente más fuertes en los astrocitos (Magistretti and Allaman 2015). Esta particularidad obliga a la cooperación astrocito-neurona en distintos aspectos que serán detallados a lo largo de la introducción.

A nivel neuronal, la capacidad de procesamiento de los circuitos neuronales ha aumentado a lo largo de la escala evolutiva, debido a las exigencias del ambiente y el comportamiento racional (Niven 2016). Sumado a este hecho, cabe destacar que la relación entre células gliales y neuronas aumenta a lo largo de la escala filogenética, por ejemplo, de alrededor de 0,1 en nematodos a alrededor de 10 en primates (Lewitus, Hof, and Sherwood 2012). Aunque no existe una cuantificación exhaustiva, el alto número de células gliales en mamíferos con funciones cerebrales superiores puede ser indicativo de que los astrocitos proporcionan un mayor grado de complejidad y capacidad computacional al cerebro. Todo esto pone en evidencia que el desarrollo glial ha sido paralelo a la adaptación neuronal. Por tanto, en mamíferos, el estudio de las células gliales en el SNC es imprescindible para una mejor comprensión de la fisiología cerebral. Los astrocitos, como mayor representante de la neuroglia, merecen una atención particular de su biología y de los procesos intra- e intercelulares que coordinan.

Consecuentemente, a pesar de que la función neuronal aún ocupe el rol más trascendente en relación con la función cerebral, el papel astrocítico es indispensable para entender la homeostasis neuronal en el SNC. Los astrocitos están dotados de una compleja maquinaria para ejecutar las diversas funciones que hemos destacado previamente. Así, son capaces de expresar los receptores y transportadores de los neurotransmisores, uniones entre distintos tipos celulares, presentan enzimas específicas de las células para el apoyo metabólico (por ejemplo, la glutamina sintetasa), así como la capacidad eliminar productos de desecho y/o de secretar numerosos factores en el medio extracelular que ejercen efectos paracrinos sobre las neuronas (Bélanger, Allaman, and Magistretti 2011; Bolaños 2016; Rama Rao and Kielian 2015; Weber and L Felipe Barros 2015). Cualquier perturbación en una o más de las funciones astrocíticas puede afectar profundamente la homeostasis neuronal, como se evidencia en las enfermedades neurodegenerativas agudas y crónicas.

3. Metabolismo energético del cerebro: glucosa, oxígeno y la cooperación astrocito-neurona.

El consumo de energía por parte del cerebro debe ser suficiente para garantizar la alta actividad neuronal. Las neuronas pueden aumentar su consumo drásticamente (hasta 30 veces) en un rango de milisegundos, lo que hace del tejido nervioso un órgano exclusivo según su amplio rango dinámico del metabolismo energético a nivel de una sola célula (Attwell and Laughlin 2001). Por eso, las necesidades energéticas del cerebro son muy elevadas en comparación con las de otros órganos. Se estima que hasta el 50% del consumo de energía cerebral se dedica a los aspectos funcionales de la sinapsis, en condiciones de reposo (Gusnard and Raichle 2001). Esto implica que en la línea base el gasto energético, además de elevado, debe ser casi constante. Así, aunque el cerebro representa sólo el 2% del peso corporal, se estima que su actividad en reposo requiere aproximadamente el 15% del gasto cardíaco, y utiliza el 20% y el 25% de los niveles totales del cuerpo de oxígeno y glucosa, respectivamente (J. Magistretti and Allaman 2016). De estas estimaciones, se deduce que la demanda energética del cerebro está estrechamente ligada al metabolismo glucídico y oxidativo. Por lo tanto, el metabolismo glucídico y la homeostasis redox serán dos aspectos fundamentales para comprender la fisiología cerebral. Continuando con lo expuesto en apartados anteriores, la comprensión de esta regulación nos lleva de nuevo al análisis celular y la colaboración astrocito-neurona.

3.1. Acoplamiento del metabolismo glucolítico de astrocitos y neuronas.

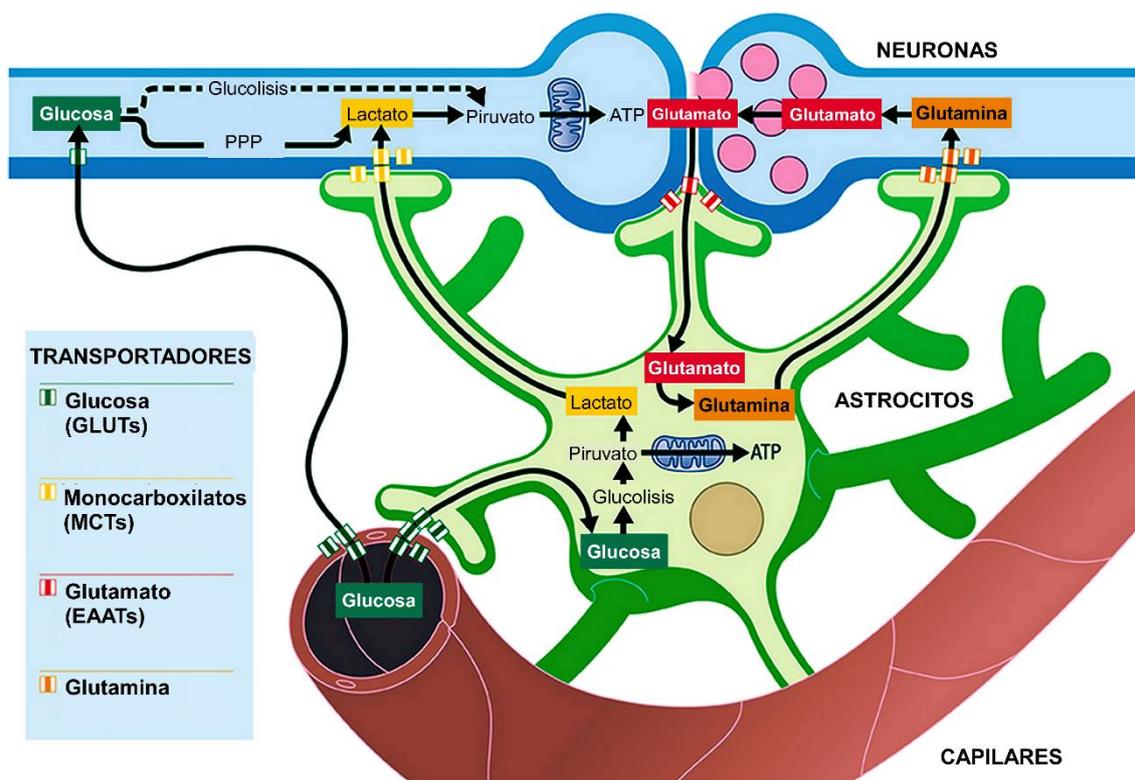
Los estudios sobre el metabolismo cerebral abarcan una amplia gama: desde el comportamiento de enzimas individuales basados en la termodinámica molecular (Schousboe et al. 2014), la variación a largo plazo del consumo de glucosa en el cerebro en individuos que envejecen (Brewer et al. 2016), la correlación del flujo sanguíneo con el consumo de oxígeno y glucosa (Gusnard and Raichle 2001), hasta modelos *in silico* que discuten sobre las rutas metabólicas seleccionadas preferencialmente para mantener la bioenergética cerebral (Court, Waclaw, and Allen 2015). Los astrocitos ocupan una posición privilegiada para regular el suministro de energía neuronal, ya que por la proximidad de sus procesos a los vasos sanguíneos tienen fácil acceso a la glucosa, mientras que sus procesos más finos rodean a las sinapsis neuronales, que son los principales puntos de consumo de energía (Nortley and Attwell 2017). La participación glial se estudió por primera vez *in vitro*, lo que permite un control óptimo de las variables experimentales. Así, los cultivos primarios de neuronas y astrocitos, en combinación con análogos de sustratos radiomarcados, han sido fundamentales para conocer sus perfiles metabólicos y la identificación de mecanismos moleculares que sostienen sus características bioenergéticas. De esta manera, se conoce que los astrocitos consumen más glucosa que las neuronas en células en cultivo y en secciones frescas de cerebro (Barros et al. 2009; Bouzier-Sore et al. 2003). Este alto consumo de glucosa por parte de los astrocitos se debe a su alta actividad glucolítica, dirigida a la producción de lactato, que sustenta la alta actividad bioquímica neuronal. Las neuronas, por su parte, confían en el metabolismo oxidativo, con el que consiguen la mayor eficiencia de producción de ATP, para garantizar los requerimientos de su alta actividad bioquímica (Mächler et al. 2016; Magistretti 2011; Magistretti and Allaman 2015; Pellerin et al. 2007; Pellerin and Magistretti 2012).

En este sentido, varios trabajos de nuestro laboratorio dirigidos a entender por qué las neuronas no utilizan la vía glucolítica y los astrocitos la utilizan de manera constitutiva, han contribuido a la comprensión de estas diferencias metabólicas. El descubrimiento de los altos niveles de expresión de la

enzima 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa-3 (PFKFB3) en los astrocitos, virtualmente ausente en las neuronas (Almeida, Moncada, and Bolaños 2004), explica uno de los mecanismos que hace posible que éstos sean capaces de mantener su vía glucolítica constitutivamente activa. La continuación de este trabajo permitió conocer que PFKFB3 se degrada continuamente en las neuronas a través del complejo E3 ubiquitina-ligasa, que forman el complejo promotor de la anafase (APC) o ciclosoma con Cdh1(APC/C-Cdh1) (*Cdh1* codificado en mamíferos por el gen *Fzr1*, del inglés *Fizzy-related* donde Fizzy se refiere a Cdc20, *Cell Division Cycle 20*, el otro colaborador de APC/C durante el ciclo celular). La constante actividad de APC/C-Cdh1 en neuronas post-mitóticas reconoce un dominio proteico tipo caja KEN (¹⁴²Lys-Glu-Asn), presente en la estructura de PFKFB3 ubiquitinándolo para su degradación vía proteasoma (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009). Se comprobó que la sobreexpresión de PFKFB3 en neuronas promueve la activación de la glucólisis acompañada de estrés oxidativo y muerte celular (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009). De igual manera, la inhibición de APC/C-Cdh1 mediante la sobre-estimación de receptores glutamatérgicos, estabiliza PFKFB3 en las neuronas produciendo muerte neuronal, que se rescata por el silenciamiento de PFKFB3 (Rodríguez-Rodríguez, Fernandez, and Bolaños 2013). En conjunto, se deduce que la glucólisis neuronal no es un proceso favorable, sino que las neuronas han adaptado su metabolismo de la glucosa para disminuir su tasa glucolítica al amparo astrocítico. Esto les proporciona a las neuronas un soporte constante de sustratos fácilmente oxidables como el lactato, por parte de los astrocitos. La conexión de ambos metabolismos a través del lactato fue el primer ejemplo de la colaboración astrocito-neurona.

3.1.1. Lanzadera de lactato entre astrocitos y neuronas.

En 1994, Luc Pellerin y Pierre Magistretti publicaron por primera vez un mecanismo que combina la actividad neuronal con la utilización de glucosa, a través de un mecanismo en el que la absorción de glutamato por parte de los astrocitos estimula la glucólisis aeróbica (Pellerin and Magistretti 1994). Este trabajo postuló por primera vez la teoría de la lanzadera de lactato entre astrocitos y neuronas (en inglés, ANLS, de *astrocyte–neuron lactate shuttle*). Así, los astrocitos presentan un metabolismo principalmente glucolítico dirigido a la producción de lactato, al servicio del metabolismo neuronal. Las neuronas consumen el lactato astrocítico utilizando preferentemente un metabolismo oxidativo, con el que consiguen la mayor eficiencia de producción de ATP para garantizar los requerimientos de su alta actividad bioquímica (**Esquema 1**). Por tanto, la especialización metabólica encubre la necesidad de colaboración entre astrocitos y neuronas. Posteriormente, esta teoría ha sido extensamente revisada y ampliado su entendimiento (Magistretti 2011; Magistretti and Allaman 2015; Pellerin et al. 2007; Pellerin and Magistretti 2012) hasta la reciente demostración *in vivo* de la existencia de un gradiente de lactato desde los astrocitos hasta las neuronas, gracias a la microscopía de dos fotones y un sensor FRET (del inglés, *Forster Resonance Energy Transfer*) codificado genéticamente para el reconocimiento del lactato (laconic) (Mächler et al. 2016; San Martín et al. 2013). Trabajos realizados en *Drosophila melanogaster* han concluido que la supervivencia neuronal depende del soporte metabólico glial, lo que sugiere que esta cooperación entre astrocitos y neuronas es un mecanismo conservado evolutivamente (Volkenhoff et al. 2015). Las revisiones actuales proponen la intervención de los oligodendrocitos en este proceso (Philips and Rothstein 2017) además de un papel renovado del lactato como molécula señalizadora necesaria, entre otras funciones, para la consolidación de la memoria más allá de su rol metabólico (Barros 2013; Bélanger et al. 2011; Magistretti and Allaman 2018).



Esquema 1. Acoplamiento del metabolismo glucolítico astrocito-neurona y reciclaje de glutamato-glutamina en la sinapsis glutaminérgica (adaptado de Demetrius, Magistretti y Pellerin 2015).

Las fuerzas impulsoras de la lanzadera de lactato son los gradientes en la concentración de piruvato y la relación NADH/NAD^+ entre los astrocitos y las neuronas. La combinación de isoformas de baja afinidad de la lactato deshidrogenasa (LDH5) y el transportador de monocarboxilatos (MCT4) para el transporte de lactato en los astrocitos, e isoformas de alta afinidad LDH1 y MCT2 en las neuronas, facilita un flujo unidireccional de lactato de astrocitos a neuronas (Weber and L. Felipe Barros 2015). Se concluye, por tanto, que las neuronas y astrocitos han adaptado su metabolismo de la glucosa de una manera diferencial pero complementaria, que refuerza la idea de que el metabolismo energético cerebral es un proceso compartimentado y que existe especialización en cada compartimento.

La glucosa es el sustrato energético predilecto del cerebro adulto. Sin embargo, en circunstancias particulares, el cerebro tiene la capacidad de utilizar otros sustratos energéticos derivados de la sangre, como los cuerpos cetónicos durante el desarrollo y la inanición o el lactato durante períodos de actividad física intensa (Bélanger et al. 2011). La glucosa entra en las células a través de transportadores específicos de glucosa (GLUTs) y puede ser procesada a través de diferentes vías metabólicas, siendo las principales la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato (PPP, del inglés, *pentose phosphate pathway*) y la glucogénesis (que en el caso del SNC, parece un ruta exclusiva de los astrocitos) (Bélanger et al. 2011). La glucosa entra en el cerebro a través del transportador de baja afinidad GLUT1 en las células endoteliales y luego es capturada por los astrocitos, también ricos en GLUT1. Las características de este transportador, hace que el flujo de glucosa pueda ser bidireccional. Las neuronas, por su parte, expresan el GLUT3, un transportador de mayor afinidad para garantizar unos niveles constantes en condiciones fisiológicas (Barros and Deitmer 2010).

3.2. Acoplamiento del metabolismo y la neurotransmisión en la cooperación astrocito-neurona.

La intervención astrocítica en el metabolismo neuronal también tiene lugar a través de mecanismos independientes del lactato como, por ejemplo, la participación en el reciclaje de neurotransmisores y otras moléculas (Nortley and Attwell 2017). Por este motivo, los trastornos del metabolismo de la glucosa en el cerebro se asocian con una excitabilidad alterada ya que en el cerebro el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en la mitocondria produce, además de los intermediarios propios del resto de tejidos, neurotransmisores como el glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA) (Schousboe et al. 2014). El metabolismo del glutamato también es otro claro ejemplo de la colaboración astrocito-neurona. Aunque es independiente se encuentra estrechamente ligado al acoplamiento metabólico glucídico. De tal forma que la presencia de glutamato estimula la actividad de los transportadores de glucosa astrocíticos (GLUT1) (Chuquet et al. 2010), promoviendo aún más la producción de lactato de origen astrocítico. De esta manera se demuestra el mecanismo implícito en el descubrimiento de la teoría de la lanzadera de lactato (Pellerin and Magistretti 1994) (**Esquema 1**).

La mayor parte del glutamato liberado durante la actividad sináptica, en lugar de ser recapturado directamente por las neuronas, es desviado a los astrocitos. Esto es posible gracias a la elevada expresión astrocítica de transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT, del inglés, *excitatory amino acid transporter*) de alta afinidad. El glutamato captado por los astrocitos se transforma en glutamina gracias a la enzima glutamina sintetasa, que se encuentra predominantemente en los astrocitos (Bak, Schousboe, and Waagepetersen 2006) (**Esquema 1**). Así, la glutamina es liberada al espacio intersináptico para ser transportada de vuelta a las neuronas y utilizarla como precursor de neurotransmisores. Este acoplamiento se conoce como el ciclo del glutamato/GABA-glutamina y constituye una transferencia bidireccional, no sólo de unidades de carbono sino también de unidades de nitrógeno (Bak et al. 2006). Debido a los pasos adicionales, el ciclo se vuelve más costoso, pero la carga recae sobre los astrocitos, lo que permite a las neuronas reducir en un 60% su inversión directa de ATP en el reciclaje de glutamato (Weber and L. Felipe Barros 2015). Además, de esta manera las neuronas se ahorran la logística de expresar la densidad excesivamente alta de los transportadores requeridos para la rápida sustracción del glutamato, optimizando su eficiencia energética. Mecanismos similares de reciclaje tras la activación neuronal también se han descrito para el GABA, la dopamina o la noradrenalina, entre otros neurotransmisores que son liberados por las neuronas activas y reciclados a través de los astrocitos (Weber and L. Felipe Barros 2015). Todo ello refuerza la proximidad de los mecanismos responsables de la actividad sináptica y el soporte metabólico que tiene lugar entre astrocitos y neuronas.

Por tanto, a pesar de que la actividad neuronal es la principal responsable del elevado consumo energético cerebral (Attwell and Laughlin 2001), estos antecedentes sugieren que el alto consumo de glucosa por parte del cerebro no parece provenir directamente de las neuronas. No obstante, la glucosa también es captada por las neuronas y principalmente consumida por la vía de las pentosas fosfato (PPP) para regenerar el poder reductor (Fernandez-Fernandez, Almeida, and Bolaños 2012) (**Esquema 1**). Aunque, también hay evidencias de la relevancia de la glucólisis neuronal en el transporte axonal rápido (FAT, del inglés, *Fast Axonal Transport*) que requiere energía a largas distancias para alimentar los motores moleculares que transportan las vesículas (Zala et al. 2013). Sin embargo, de manera general son los astrocitos a través de sus procesos quienes contactan de manera directa con los vasos sanguíneos

lo que le facilita el acceso a la glucosa, y con los procesos más finos que rodean a las sinapsis coordinan el suministro energético neuronal directamente en los principales puntos de consumo de energía (Nortley and Attwell 2017).

3.3. Aspectos del metabolismo oxidativo comparado entre astrocitos y neuronas.

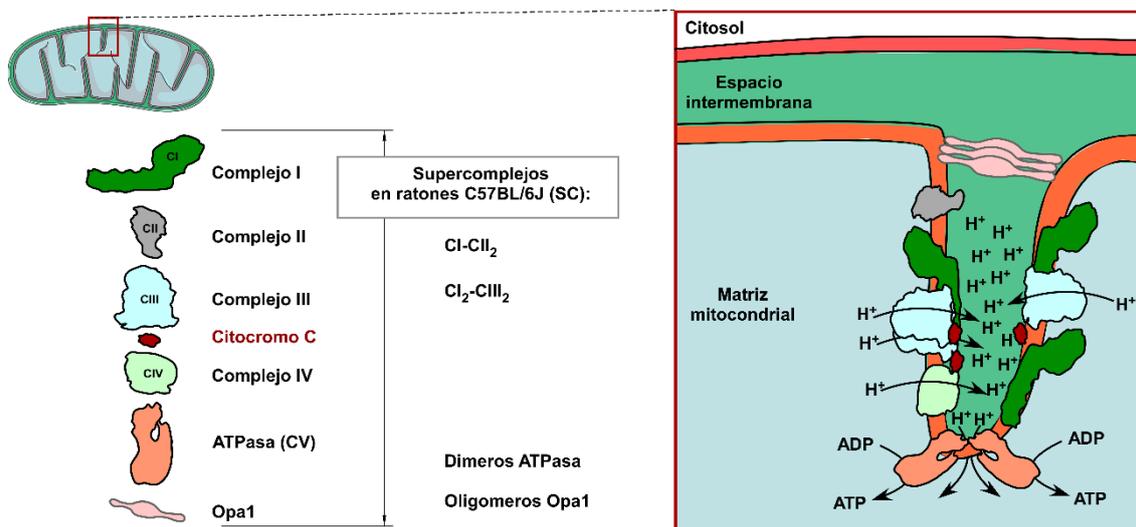
El análisis de imágenes cerebrales adquiridas mediante tomografía por emisión de positrones y resonancia magnética funcional reveló que la actividad cerebral se asocia con aumentos locales en el flujo sanguíneo, así como en el consumo de glucosa, sin una respuesta proporcional en el consumo de oxígeno (Buxton 2010; Gusnard and Raichle 2001). Sin embargo, el consumo total de oxígeno del cerebro es casi constante aunque la presión parcial y su consumo puede variar localmente entre regiones y durante diferentes estados de actividad (Huchzermeyer et al. 2013; Lyons et al. 2016). Así, el elevado consumo de glucosa por parte del metabolismo cerebral está acompañado de un alto consumo de oxígeno, hasta un 20% del total inhalado (J. Magistretti and Allaman 2016). El desfase entre el consumo de glucosa y el de oxígeno apoya la compartimentación que tiene lugar en las células del cerebro según su metabolismo diferencial. En el SNC, la densidad mitocondrial es generalmente mucho mayor en las neuronas en relación con otros tipos celulares, lo que refleja su dependencia de la fosforilación oxidativa para la producción de ATP (Rossi and Pekkurnaz 2019). Así, el elevado consumo de oxígeno cerebral se explica por el alto metabolismo oxidativo en las mitocondrias de las neuronas a partir de los sustratos derivados de la actividad glucolítica de los astrocitos.

La fosforilación oxidativa que tiene lugar en la mitocondria es, desde el punto de vista cuantitativo, la forma más eficiente de producción de energía en forma de ATP. Las neuronas muestran una red extensamente conectada a lo largo del área somatodendrítica, mientras que en los axones encontramos mitocondrias más individualizadas con un patrón punteado (Rossi and Pekkurnaz 2019). Así, esta distribución de las mitocondrias en las neuronas sugiere necesidades energéticas específicas según sus diferentes subcompartimentos. La actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial, que favorece la producción de ATP, es dependiente del consumo de oxígeno. En consecuencia, la red mitocondrial es la principal fuente cuantitativa de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés, *reactive oxygen species*) (Murphy 2009). De esta manera se explica que disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo son factores generalmente ligados y comunes en el desarrollo de enfermedades neurológicas (Islam 2017). Aunque es la CTE mitocondrial la principal responsable del mayor porcentaje de ROS mitocondriales y celulares, en la mitocondria también encontramos otras fuentes enzimáticas productoras de ROS (Brand 2010). Se estima que aproximadamente el 1–2% del oxígeno consumido en la mitocondria se transforma indeseadamente en anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Principalmente, esto es debido a que, mediante el transporte reverso de electrones a nivel del complejo I, los electrones transportados en la CTE se transfieren directamente al oxígeno (Murphy 2009).

Recientemente, en nuestro laboratorio nos propusimos estudiar los niveles endógenos de ROS en astrocitos y neuronas como contribución a las características metabólicas de estos tipos celulares (Lopez-Fabuel et al. 2016). Fruto de este trabajo, demostramos que la diferente configuración de la CTE entre astrocitos y neuronas, apoya las diferencias metabólicas de ambos tipos celulares y explica el resultado de que los ROS astrocíticos son un orden de magnitud mayor que los neuronales (Lopez-Fabuel et al. 2016).

3.3.1. Supercomplejos mitocondriales: transporte de electrones y producción de especies reactivas de oxígeno.

La visión tradicional de que la cadena de transporte de electrones (CTE) es una estructura estática embebida en la membrana mitocondrial interna (MMI) ha sido ampliamente revisada. En este sentido, en el año 2000 se elaboró la primera propuesta de la teoría de los supercomplejos (SC) y propuesta del modelo de respirasoma, formado por unidades de los complejos I, III y IV de la CTE (Schägger and Pfeiffer 2000). Este trabajo demostró la existencia de un fenómeno, conservado entre levaduras y mamíferos, por el cual los complejos no están distribuidos aleatoriamente en la MMI. Así, los complejos pueden interactuar y ensamblarse para formar estructuras supramoleculares. Posteriormente, se demostró la funcionalidad del respirasoma y se propuso el modelo de plasticidad (Acín-Pérez et al. 2008a). Este modelo postula que la mayoría de CII, CIV y una proporción relevante de CIII se encuentran libres de asociación y parecen moverse libremente sobre la MMI mientras que la mayoría de CI está estabilizado por el dímero que forman con el CIII, con o sin varias copias de CIV. Esta organización es una red dinámica en la que coexisten diferentes asociaciones, así como los complejos individuales (Acin-Perez and Enriquez 2014a; Guo et al. 2018) (**Esquema 2**).



Esquema 2. Modelo simplificado de la cadena de transporte de electrones en el interior de una cresta mitocondrial mantenida por la proteína de anclaje Opa1.

La membrana mitocondrial externa es similar a la membrana plasmática celular, mientras que la membrana interna donde encontramos a los complejos de la CTE es más compleja, debido a los pliegues que dan forma a las crestas mitocondriales. Así, en las crestas aumenta la distancia entre ambas membranas para formar cavidades y en el resto de las regiones ambas membranas están más próximas. Las crestas mitocondriales y sus formas influyen en la formación de supercomplejos y está estrechamente relacionada con el envejecimiento y la apoptosis celular (Cogliati et al. 2013). Sin embargo, la organización exacta de la cadena respiratoria nunca ha logrado el consenso y ha sido desafiada continuamente por la evidencia emergente. Se ha demostrado que la estequiometría de los supercomplejos y formas de las crestas puede variar en diferentes condiciones fisiológicas, tipos celulares o entre especies (Guo et al. 2018; Sun et al. 2016). Varios grupos han demostrado mediante técnicas de microscopía electrónica avanzada (cryo-ET), que los complejos de la CTE responsables de generar el gradiente de protones se encuentran localizados en la superficie relativamente plana de la cresta,

mientras que los dímeros de la ATPasa están localizados en el borde de la curva de la cresta y alineados (Guo et al. 2018). Según esta disposición se puede evitar en gran medida la fuga de protones formando un sumidero en el que los dímeros de ATPasa aprovechan el gradiente de protones con la mayor eficiencia (**Esquema 2**).

Independientemente de la falta de consenso que enriquece el debate e interés de este campo en auge, existen numerosos estudios demuestran la existencia de ensamblajes supramoleculares entre complejos de la CTE (Acin-Perez and Enriquez 2014a; Boekema and Braun 2007). De tal forma que se proponen varios papeles funcionales para los SC. Entre ellos, se acepta que la formación de SC favorece: 1) la aceleración del transporte de electrones limitando la formación de intermediarios reactivos y la generación de ROS y 2) el incremento del ratio de fosforilación oxidativa (Acin-Perez and Enriquez 2014a).

3.3.2. Diferencias en la configuración de supercomplejos mitocondriales en astrocitos y neuronas.

Una vez conocido este contexto, es conveniente retomar el descubrimiento por parte de nuestro laboratorio de que las neuronas, a pesar de su dependencia energética de la CTE para la producción de ATP, producen 10 veces menos ROS en comparación con los astrocitos (Lopez-Fabuel et al. 2016). Este trabajo demostró que esta diferencia en los niveles de ROS tiene origen en las diferencias del grado de ensamblaje del complejo I en la CTE de neuronas y astrocitos. Concretamente, se demostró que en las neuronas la mayoría del complejo I se presenta asociado a SC, favoreciendo la eficiencia del transporte de electrones de la que tanto depende este tipo celular, mientras que en los astrocitos la abundancia de complejo I libre es mayor (Lopez-Fabuel et al. 2016). El transporte de electrones a través del complejo I libre aumenta la probabilidad de que puedan ser directamente transferidos al O_2 con la consecuente generación de O_2^- (Acin-Perez and Enriquez 2014a).

Además, se concluyó que en el mecanismo está involucrada la subunidad S1 del Complejo I-NADH-ubiquinona oxidorreductasa (NDUFS1, del inglés, *NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S1*), cuya abundancia demostró mucho mayor en las neuronas que en los astrocitos (Lopez-Fabuel et al. 2016). Las diferencias en este factor de ensamblaje explican el alto porcentaje de complejo I libre en los astrocitos. A su vez, esto se correlaciona con una producción 10 veces mayor de ROS en comparación con las neuronas. La prueba de la relación entre el grado de ensamblaje y la producción de ROS se confirmó a través de la modulación de NDUFS1 en neuronas y astrocitos. Curiosamente, la reducción de esta subunidad NDUFS1 en el complejo I multiproteico de las neuronas redujo la asociación de éste a SC, favoreciendo una disminución del consumo de oxígeno y a un aumento de los ROS de origen mitocondrial (mROS). Mientras, la sobreexpresión de NDUFS1 en astrocitos promovió el ensamblaje del complejo I en SC, disminuyendo ROS pero sin alterar el consumo de oxígeno (Lopez-Fabuel et al. 2016).

Los mecanismos implicados en el contraste de los niveles endógenos de mROS entre astrocitos y neuronas contribuyen a entender sus diferencias metabólicas. No obstante, esto contrasta con el papel antioxidante que ejercen los astrocitos en el cerebro (Bolaños 2016; Fernandez-Fernandez et al. 2012). En respuesta a estrés oxidativo, los astrocitos se vuelven reactivos, adquiriendo un fenotipo caracterizado por reordenamientos citoesqueléticos, hipertrofia, pérdida de complejidad estructural, cambios en el metabolismo y secreción de citoquinas inflamatorias (Pekny and Pekna 2014). Estos cambios durante la gliosis se consideran una respuesta adaptativa para la contención efectiva de la lesión aguda y la reparación de heridas, pero puede llegar a ser dañina si los astrocitos descuidan su papel de apoyo a las

neuronas (Pekny and Pekna 2014). Esta paradoja, entre los elevados niveles de ROS y su función protectora podría encubrir un nuevo ejemplo de la compartimentación de las células del cerebro y división de funciones que involucra a los ROS. Aunque para poder comprender la relevancia funcional de los altos niveles de mROS astrocíticos, primero será necesario profundizar en los aspectos relativos a la homeostasis redox celular.

4. Especies reactivas de oxígeno.

El término de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés, *reactive oxygen species*) es un término colectivo que engloba a diversas especies químicas originadas a partir de la reducción incompleta del oxígeno e incluye al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH\cdot$). En otras ocasiones podemos encontrarlas en la bibliografía mencionadas simplemente como “radicales libres” y también podemos encontrar clasificaciones más extensas que pueden incluir a intermediarios como el ozono (O_3) y oxígeno singlete (1O_2), intermediarios hipoclorosos (HOCl), hipobromosos (HOBr) y ácidos hipoyodosos (HOI), que surgen por la oxidación de haluros catalizada por peroxidasa. Dentro de especies reactivas también han sido ampliamente estudiadas la especies derivadas del nitrógeno (RNI) que incluyen los radicales de óxido nítrico ($NO\cdot$), los radicales de dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$), el nitrito (NO_2^-) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Finkel and Holbrook 2000; Nathan and Ding 2010). Desde que en 1956 Denham Harman publicase su famosa teoría del envejecimiento causado por los radicales libres mitocondriales (Liu, Long, and Liu 2014) la investigación de los ROS ha estado dirigida hacia su toxicidad debido a su mayor reactividad química con respecto al oxígeno. No obstante, durante las últimas 3 décadas numerosos trabajos de investigación sugieren que los ROS también pueden funcionar como moléculas de señalización intracelular, una función que ha sido ampliamente documentada pero que sigue siendo controvertida. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) son los ROS más estudiados y en los que se centrará principalmente este trabajo (Hopkins 2016b, 2016a).

En primer lugar, para poder comprender los aspectos del controvertido papel de los ROS será necesario tratar de comprender las principales fuentes celulares origen de su formación de. Además, analizaremos los principales componentes de la maquinaria antioxidante celular en el sistema nervioso central que garantizan el equilibrio y la homeostasis del estado redox celular en el cerebro. Todo ello resumido en el **Esquema 3**.

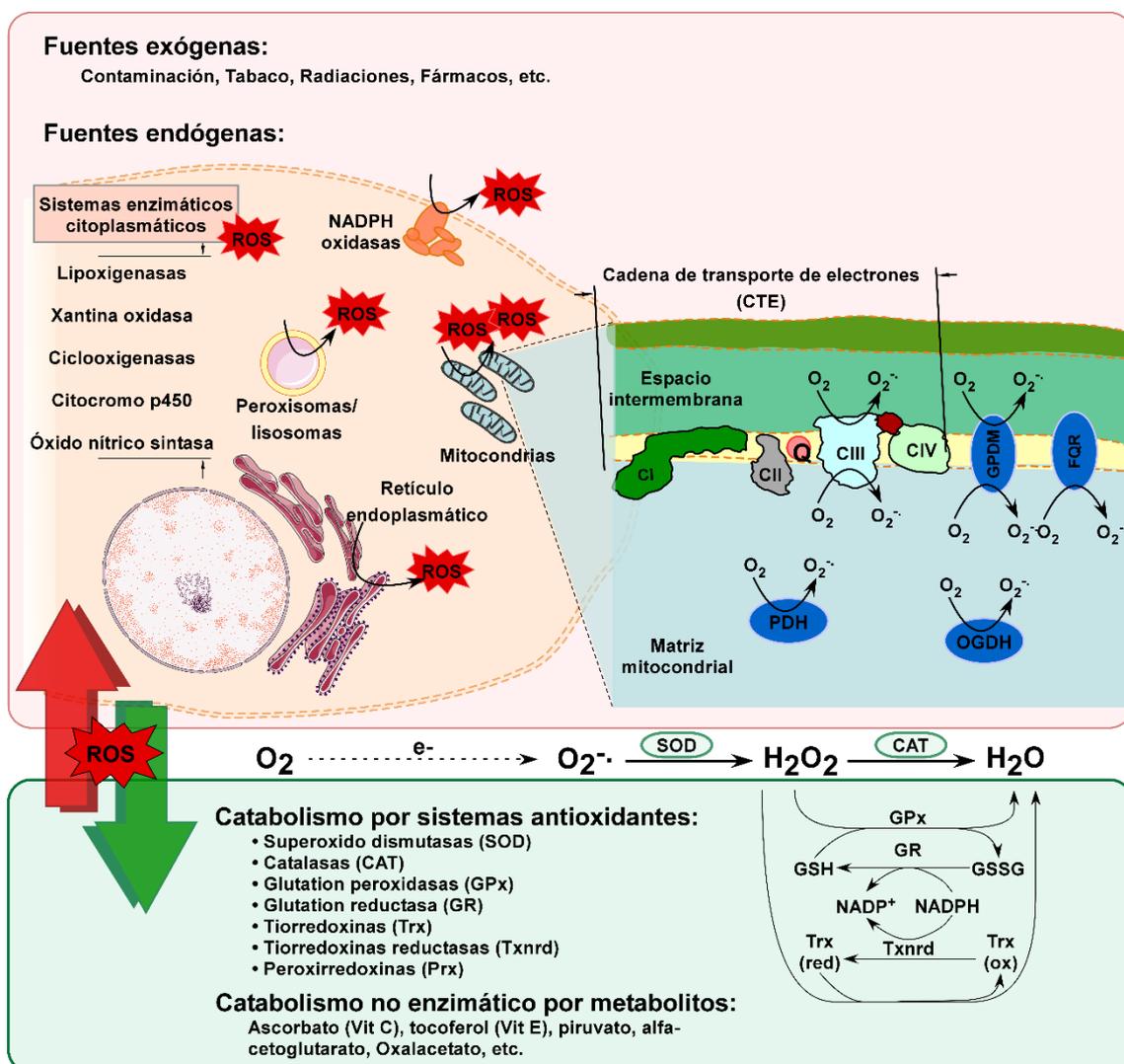
4.1. Fuentes celulares de ROS.

Además de los factores externos que favorecen la formación de ROS, entre los que encontramos la contaminación, las radiaciones ultravioletas y gamma, causas farmacológicas o patológicas, las células de mamífero producen ROS de manera natural con origen en diversos compartimentos celulares. Estas fuentes internas abarcan proteínas de membrana, enzimas citoplasmáticas o pertenecientes a diversos orgánulos que incluyen mitocondria, retículo endoplasmático, lisosomas o peroxisomas (Görlach et al. 2015). A continuación, detallaremos estos sistemas con especial atención al origen mitocondrial de los ROS debido a su relevancia cuantitativa y cualitativa.

Membrana plasmática

La familia de las NADPH oxidasas (NOX, del inglés, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases*) son las enzimas más características por la formación de ROS desde la membrana plasmática. Esta familia de enzimas la conforman multi-complejos de unidades proteicas asociados a membrana plasmática, su

actividad enzimática cataliza la reducción de oxígeno en anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), utilizando NADPH como donante de electrones y consumiendo oxígeno como último aceptor de electrones. En la mayoría de los mamíferos encontramos siete isoformas diferentes: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, y las oxidasas duales (DUOX, del inglés, *dual oxidase*) DUOX1, y DUOX2. En general, estas isoformas comparten el corazón de su estructura catalítica formado por las subunidades p22phox y gp91phox que dan lugar a una estructura superior denominada flavocitocromo b558. La expresión de las diversas isoformas es dependiente de tejido, tipo celular y condiciones (Nayernia, Jaquet, and Krause 2014). Multitud de trabajos comparan las diferencias entre isoformas que se adaptan a las necesidades del tejido donde se expresan, pero las diferencias no van más allá de la capacidad de esta familia de enzimas para formar ROS. Por ejemplo, destaca el papel de NOX2 en la respuesta inmunitaria innata. Esta isoforma es la más expresada en los neutrófilos y ante una respuesta inmune frente a un patógeno externo estas células llevan a cabo una denominada explosión oxidativa a través de la producción de ROS con objeto de acabar con la invasión. En el SNC principalmente se expresan las isoformas NOX1-4, aunque no se descarta la expresión de otras isoformas bajo ciertas circunstancias (Nayernia et al. 2014).



Esquema 3. Resumen esquemático de las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS) celulares y los sistemas antioxidantes que garantizan el equilibrio redox.

Retículo endoplasmático (RE)

Dentro de este orgánulo, los ROS son principalmente producidos por la proteína oxidorreductasa ERO1 (del inglés, *endoplasmic oxidoreductin 1*). ERO1 utiliza el poder oxidativo del oxígeno molecular para generar enlaces disulfuro en proteínas sintetizadas *in situ* favoreciendo su correcta conformación. Por tanto, el plegamiento de proteínas por este mecanismo oxidativo tiene especial relevancia como origen celular de ROS. Además, varias enzimas de la familia de las NOX se han encontrado localizadas en el RE, incluso está descrita la colaboración de éstas con proteínas de la maquinaria de plegamiento como los miembros de las proteínas disulfuro isomerasa (PDI) que gracias a dominios tipo tioredoxina catalizan la isomerización o formación de puentes disulfuro inter- o intra- moleculares durante el plegamiento de proteínas que tiene lugar en el RE (Yoboue, Sitia, and Simmen 2018).

Lisosomas

Los lisosomas se ocupan principalmente de la degradación de material intra- y extracelular, en consecuencia, integran las funciones de fagocitosis, endocitosis y autofagia. El pH ácido de este orgánulo garantiza esta función y éste lo consigue gracias a una bomba de protones similar a la que encontramos en las mitocondrias, y los mecanismos de generación de ROS son similares a los de este orgánulo (Görlach et al. 2015). Durante la degradación de macromoléculas que tiene lugar en los lisosomas se acumulan el hierro y el cobre procedentes de las proteínas recicladas en este orgánulo. Debido al ambiente ácido y reductor lisosomal, el hierro se encuentra principalmente en estado divalente, pudiendo ser activo como poder reductor mientras que el contenido de cobre lisosomal suele estar asociado a grupos tiol lo que reduce probablemente su actividad redox (Kurz, Eaton, and Brunk 2010).

Peroxisomas

La relación de los peroxisomas con el metabolismo celular está altamente relacionada ya que este orgánulo es crucial por su participación en procesos metabólicos como la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato, la síntesis de fosfolípidos, purinas, poliaminas y aminoácidos (Fanelli et al. 2013). Muchas de las proteínas involucradas en estos procesos son oxidasas dependientes de flavinas que producen H_2O_2 como subproducto. No obstante, es la β -oxidación la actividad que más contribuye a la formación de ROS en este orgánulo en forma de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ a través de la xantina oxidasa peroxisomal. Precisamente, la alta expresión de la enzima catalasa en este orgánulo tendría como objetivo la detoxificación del H_2O_2 resultante de la β -oxidación hasta O_2 y H_2O . Los peroxisomas también participan en el metabolismo de eicosanoides, esteroides y hormonas peptídicas, así como en la síntesis de ácidos grasos específicos, como el ácido docosahexaenoico (DHA) y los plasmalógenos (PLGN). Muchos de estos metabolitos están involucrados en importantes vías de transducción de señales o sirven como componentes celulares indispensables para el crecimiento de las células neurales, la función de la retina y el desarrollo del cerebro (Fanelli et al. 2013). No obstante, los peroxisomas son una pieza clave en el metabolismo aunque también relativamente indefensos ya que dependen en gran medida de su interacción con otros orgánulos para metabolizar los productos finales de su metabolismo (Yoboue et al. 2018).

Mitocondrias

Las mitocondrias constituyen la mayor fuente de ROS celulares, principalmente derivados de la actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE) (Murphy 2009). También existen otras enzimas del metabolismo que contribuyen a la formación de ROS mitocondriales (mROS). Por ejemplo, en la

matriz mitocondrial encontramos la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa (OGDH, del inglés, *2-oxoglutarate dehydrogenase*) y/o la piruvato deshidrogenasa (PDH, del inglés, *pyruvate dehydrogenase*), y asociadas a la membrana interna mitocondrial encontramos a la glicerol-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (GPDM, del inglés, *mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase*) y la flavoproteína de transporte de electrones ubiquinona oxidorreductasa (FQR). En conjunto, la localización de estos sistemas contribuye a la producción de mROS tanto en el espacio intermembrana como en la matriz mitocondrial (Brand 2010; Kira M. Holmström and Finkel 2014; Murphy 2009) (ver el **Esquema 3**).

La generación de $O_2^{\cdot-}$ dentro de la matriz mitocondrial depende críticamente la fuerza protón motriz, los ratios de NADH/NAD⁺ y CoQH₂/CoQ o la presión de oxígeno (Murphy 2009). Dentro de la CTE mitocondrial la formación de $O_2^{\cdot-}$ ocurre principalmente a nivel del complejo I (NADH deshidrogenasa) y en el complejo III (Ubiquinona-Citocromo c reductasa). Se estima que entre el 1-2% de los electrones circulantes por la CTE escapan de este transporte produciendo directamente $O_2^{\cdot-}$, este porcentaje se estima aún mayor ante algunas situaciones como la hipoxia, tras incrementos de Ca²⁺ intracelular, etc. (Nathan and Ding 2010).

Otro de los aspectos que puede modular la formación de mROS a nivel de la CTE es la ultraestructura de ésta, como ya se mencionó en el *apartado 3.3*. Numerosos estudios demuestran la existencia de ensamblajes supramoleculares entre complejos de la CTE, que se conocen como supercomplejos (SC) y cuya formación incrementa el ratio de fosforilación oxidativa (Acin-Perez and Enriquez 2014a; Boekema and Braun 2007). La composición de los SC es variada entre varias unidades de los complejos mitocondriales; I+III₂, III₂+IV₁₋₂ ó I+III₂+IV₁₋₄ también denominados respirasoma. Además, se consideran SC mitocondriales otros como la formación de dímeros de la ATP-sintasa. Su existencia es un hecho probado en múltiples especies (mamíferos, plantas, algas, hongos) que sugieren que esta configuración superior es un fenómeno natural con un valor funcional (Boekema and Braun 2007; Guo et al. 2018).

Sin embargo, algunos aspectos de su formación siguen siendo objeto de debate. En este sentido, la manipulación genética de unidades del respirasoma ha demostrado que el ensamblaje en SC es un proceso dinámico y organiza el flujo de electrones para optimizar el uso de los sustratos disponibles (Acin-Perez and Enriquez 2014a). Por tanto, la formación de SC confiere una ventaja, pero no esencial, ya que también su configuración no es universal. Por ejemplo, se ha demostrado cómo las diferencias entre los factores de ensamblaje que se conocen pueden limitar las interacciones entre complejos. La primera proteína para la que se identificaron estas propiedades fue la subunidad 7A2 de la citocromo C oxidasa (Cox7a2I), que es necesaria para la interacción estable entre los complejos III y IV y ha sido rebautizada como factor de ensamblaje supercomplejo I (SCAFI, del inglés *supercomplex assembly factor I*) (Lapiente-Brun et al. 2013). Este estudio demostró que algunas cepas de ratón, incluyendo C57BL/6J, poseen una variante de este gen que impide la formación de SC III₂+IV o I+III₂+IV. Por tanto, la expresión de estas proteínas de ensamblaje modula la formación de SC puede variar entre especies, dentro de la especie e incluso entre tipos celulares.

En lo que respecta a las diferencias entre tipos celulares, continuando con lo adelantado en el *apartado 3.3*, un trabajo reciente llevado a cabo en nuestro laboratorio reveló que otro factor de ensamblaje, en este caso la subunidad NDUF51 del complejo I explica las diferencias en SC entre neuronas y astrocitos (Lopez-Fabuel et al. 2016). Los altos niveles de esta subunidad en las neuronas, en comparación con lo detectado en astrocitos, demostraron que a las neuronas les sirve para favorecer que

la mayoría del complejo I se encuentre asociado a SC. Mientras que los niveles astrocíticos favorecen un mayor porcentaje de complejo I libre lo que aumenta la probabilidad de que los electrones se transfieran directamente al oxígeno molecular para formar ROS. Así, se explica que los astrocitos presentan niveles endógenos de ROS de un orden de magnitud mayor que las neuronas y el papel funcional de los SC (Lopez-Fabuel et al. 2016).

4.2. Defensa antioxidante celular.

Para mantener la homeostasis redox las células cuentan con una amplia batería de sistemas antioxidantes enzimáticos. Estos sistemas no sólo serán importantes para contrarrestar la producción endógena de ROS, cuyo exceso puede generar efectos deletéreos, sino como defensa ante agentes externos o situaciones patológicas que favorecen la producción de ROS. Entre todas estas enzimas destacan las superóxido dismutasas, las catalasas y las enzimas del ciclo redox del glutatión; glutatión peroxidasas y reductasas, que unen la reducción del peróxido o la oxidación y la regeneración del glutatión reducido. El glutatión es fundamental para mantener el estado redox. Su función está preservada en levaduras y sensores codificados genéticamente han permitido conocer detalles su regulación como la participación de las tiorredoxinas (Conrad, Schick, and Angeli 2013; Morgan et al. 2013; Nathan and Cunningham-Bussel 2013) (ver **Esquema 3**)

Las diversas formas de superóxido dismutasas (SODs), en el citosol (SOD1 o Cu/Zn-SOD), en la mitocondria (SOD2 o Mn-SOD) o en el espacio extracelular (SOD3), se encargan de neutralizar rápidamente el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Okado-Matsumoto and Fridovich 2001). Esta conversión tiene una gran relevancia fisiológica debido a que la reactividad del H_2O_2 es mucho menor que $O_2^{\cdot-}$. Además, el H_2O_2 es relativamente estable con una vida media celular ~ 1 ms, niveles de estado estacionario $\sim 10^{-7}$ M (D'Autréaux and Toledano 2007). Por último, es una molécula más versátil debido a su facilidad de difusión, modulada por la permeabilidad de las membranas o por el transporte a través acuaporinas. Por tanto, el H_2O_2 tiene un profundo impacto en la homeostasis redox como agente señalizador (Lee et al. 2011; Reczek and Chandel 2015; Sies 2014a; Young et al. 2019) y sus niveles necesitan ser regulados estrictamente. Por este motivo, las células utilizan diferentes sistemas enzimáticos que lo neutralizan hasta disociarlo en agua. Las más importantes son las tiorredoxinas, el glutatión y la catalasa.

La catalasa (CAT) se encuentra principalmente localizada en el peroxisoma donde cataliza la dismutación del H_2O_2 para producir H_2O y oxígeno molecular como productos finales. Según el tipo celular encontramos diferentes isoformas de catalasas que se diferencian en su estructura cuaternaria, aunque en todas ellas encontramos un grupo hemo-hierro como sitio catalítico. Se requieren dos moléculas de H_2O_2 por sitio activo y su evolución ha derivado en la formación de tetrámeros de monómeros idénticos. Esto le aporta una eficiencia única siendo mayor a concentraciones altas (Chelikani, Fita, and Loewen 2004).

El sistema tiorredoxinas está compuesto por peroxirredoxinas (Prx), tiorredoxinas (Trxs) y tiorreductasas (Txnrd). Estas enzimas actúan de manera secuencial donde las peroxirredoxinas reaccionan con el H_2O_2 y son posteriormente reducidas por Trx y Txnrd en una serie de reacciones de intercambio de disulfuro (Holmgren and Lu 2010).

Los sistemas dependientes del glutatión se componen de varias familias de enzimas principalmente las glutatión peroxidasas (GPx), las glutaredoxinas (Grx) y las glutatión-S-transferasas (GST). Estas enzimas se presentan en diversos compartimentos celulares y son fundamentales junto con otras enzimas como la glutatión reductasa (GR), la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS) y la glutatión sintetasa (GS) en la formación del glutatión total y el mantenimiento de su ratio oxidado/reducido (GSSG/GSH).

No obstante, este tipo de enzimas redox no son el único componente de la defensa antioxidante ya que existe una estrecha regulación del metabolismo con la producción de ROS. En este sentido, se ha descrito que otras muchas moléculas pequeñas, con capacidad de reciclarse o reestablecerse, pueden reaccionar con los ROS de forma no enzimática lo que les confiere una capacidad de amortiguación de ROS. Entre estas moléculas se incluyen el ascorbato o algunos α -cetoácidos como el piruvato, α -ketoglutarato y el oxaloacetato (Nathan and Cunningham-Bussel 2013). Además, existen enzimas metabólicas capaces de modular el equilibrio redox. Por ejemplo, la piruvato quinasa implicada en la glucólisis y la gluconeogénesis, es crucial en la regulación negativa mediada por ROS. La oxidación del residuo Cys³⁵⁸ de esta enzima inhibe su actividad produciendo una reducción del flujo glucolítico que dirige el consumo de glucosa hacia la vía de las pentosas fosfato. La activación de esta vía aumenta la producción de NADPH, mantiene la reducción del glutatión oxidado y de las tioredoxinas reductasas devolviendo así los ROS a los niveles fisiológicos (Anastasiou et al. 2011). Este mecanismo descrito en células cancerígenas conecta la adaptación metabólica como sistema de amortiguación del estado redox, y conecta la vía glucolítica con la vía de las pentosas fosfato. Ambas rutas han demostrado estar mutuamente conectadas también en el metabolismo de las células del SNC (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009).

5. Relevancia fisiopatológica de los ROS.

En nuestro objetivo de estudiar los fenómenos metabólicos y la fisiopatología del cerebro, nos interesa conocer la contribución de los ROS en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. La enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple o los ictus por accidente cerebrovascular o isquemia vascular, etc. son un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por la destrucción progresiva e irreversible de poblaciones neuronales específicas con un origen complejo y multifactorial. Sin embargo, un factor crítico en común en muchas de ellas es la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo (Emerit, Edeas, and Bricaire 2004; Islam 2017; Mattson and Arumugam 2018; Pfrieger and Ungerer 2011; Shukla, Mishra, and Pant 2011). La contribución de los ROS a la etiología de estas enfermedades es variable y controvertida, en general, los mecanismos involucrados son ubicuos. Así, en la cascada de eventos que conducen a la muerte neuronal durante el estrés oxidativo incluyen la disfunción mitocondrial, apoptosis, excitotoxicidad, inflamación, formación de agregados de proteínas mal plegadas, bloqueos en la actividad del proteasoma, entre otros (Redmann, Darley-Usmar, and Zhang 2016; Wang et al. 2018).

Otro riesgo oxidativo del cerebro, además del ya destacado alto consumo de oxígeno necesario para mantener su alta actividad metabólica, es su composición. El sistema nervioso es rico en metales y presenta un alto contenido de ácidos grasos insaturados, que lo convierten en un órgano especialmente susceptible a daño oxidativo (Georgieff 2007). Independientemente del debate en torno al papel de los ROS como causa o efecto en la sintomatología de las enfermedades neurodegenerativas, el papel mitocondrial ha sido estudiado con detalle en estas patologías por su relación con la bioenergética

cerebral y la producción de ROS (Van Houten, Woshner, and Santos 2006; Islam 2017; Sharma, Johnston, and Hossain 2014; Weissman et al. 2007).

5.1. Implicación de los ROS en enfermedad.

La homeostasis redox, de acuerdo con lo destacado anteriormente, requiere una compleja regulación de los sistemas implicados para garantizar un equilibrio adecuado. Se considera estrés oxidativo la pérdida del equilibrio del sistema redox que depende tanto de una producción controlada de ROS como de un correcto funcionamiento de los sistemas antioxidantes. En conjunto, la acumulación progresiva o aguda de estrés oxidativo puede conllevar a daño oxidativo en distintas biomoléculas. A pesar de esta ubicuidad, los ROS muestran un tipo de especificidad que es más atómica más que molecular (Nathan and Cunningham-Bussel 2013) (**Esquema 4**). Así, existen átomos específicos especialmente sensibles a la acción de los ROS están presentes en muchas macromoléculas: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (ADN). Aunque la acción de los ROS sobre estos átomos es a menudo reversible según el grado de exposición (Nathan and Cunningham-Bussel 2013), su amplio espectro aumenta el riesgo de sus efectos deletéreos y de las implicaciones funcionales del estrés oxidativo (**Esquema 4**).



Esquema 4. Relevancia funcional de la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre las biomoléculas a partir de la especificidad de acción sobre átomos hipersensibles a la acción oxidativa.

El daño oxidativo a los lípidos causa peroxidación de lípidos y formación de esteroides oxidados, que se localizan principalmente en la membrana celular que altera la señalización celular a través de proteínas de membrana (Freitas et al. 2017). El daño oxidativo a las proteínas puede resultar en disfunción proteica a través de carbonilaciones en residuos de arginina, lisina, prolina o treonina o por la oxidación de residuos de cisteína (Cys) en el sitio activo de muchas enzimas, también afectando a la oxidación de metales. Por último, el daño del ADN puede afectar al núcleo y también al ADN mitocondrial. Entre sus efectos destacan la formación de aductos como el 8-oxo-guanina, la rupturas de cadena doble o simple, pérdidas de bases con la consecuente formación de sitiosapurínico/apirimidínico (AP) y todo ello juega un papel importante en la formación de mutaciones. Por lo tanto, el estrés oxidativo a través de la modificación oxidativa de las distintas biomoléculas y sus funciones o vías de señalización conduce a un gran número de efectos pleiotrópicos mediante la desregulación de los ciclos celulares, la interferencia con el metabolismo celular, la acumulación de mutaciones o cambios epigenéticos que genera inestabilidad cromosómica (Nathan and Cunningham-Bussel 2013). En consecuencia, encontramos huellas de estrés oxidativo en numerosas patologías incluyendo el cáncer, cardiopatías y enfermedades neurodegenerativas (Thanan et al. 2014).

No obstante, independientemente del origen de estrés por un aumento de la producción neta o un fallo en el catabolismo de los ROS, las células también cuentan con sistemas para reparar el daño oxidativo y, por tanto, el desarrollo de una patología también debe incluir el fallo en este punto de control. Por ejemplo, las metaloproteínas son vulnerables a las acción de los ROS porque éstos pueden reaccionar con sus centros de hierro-azufre (Fe-S), los grupos sulfuro pueden oxidarse y perder átomos de hierro perdiendo su función, la formación de grupos carbonilos en las cadenas laterales de aminoácidos de las proteínas también es un daño oxidativo irreversible y van a requerir la intervención del proteasoma o autofagosomas. La oxidación del ADN por ROS activa la reparación de la escisión de bases y nucleótidos generales, pero también otras vías específicas como la proteína de reparación 8-oxoguanina ADN glucosilasa1 (OGG1), que reconoce específicamente los residuos de 8-oxoguanina (8-oxoG), una de las modificaciones más abundantes generados por ROS. Por tanto, la vulnerabilidad ante los ROS requiere de un fallo multifactorial en el que pueden estar involucrados todos los mecanismos mencionados. Además, muchos de estos mecanismos están conservados a lo largo de la evolución y pueden ser de gran relevancia para el estudio de los mecanismos involucrados en la sensibilidad a los ROS. Por ejemplo, un estudio llevado a cabo con mutantes hipersensibles al daño oxidativo de *Saccharomyces cerevisiae* permitió identificar nuevos genes implicados en la resistencia a los ROS que incluyen factores de transcripción, proteínas reguladoras del tráfico de proteínas, metabolismo de esteroides, cascada de autofagia o proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial (Thorpe et al. 2004).

5.2. Papel señalizador de los ROS: cascadas de señalización y factores de transcripción.

Muchos de los aspectos destacados en el papel deletéreo de los ROS surgen de los efectos pleiotrópicos de estas moléculas que originan una respuesta compleja a través de la modulación de diversas clases funcionales. Sin embargo, las mismas propiedades destacadas para sus efectos deletéreos, advierte de que los efectos mediados por ROS son de amplio espectro porque sus propiedades facilitan la transmisión de señales a múltiples vías a la vez. Encontramos átomos especialmente vulnerables presentes en todas las macromoléculas, pero alguna moléculas incorporan en su diseño esta serie de átomos o grupos sensibles, como parte indispensable de la función que desempeñan. De esta manera, encontramos ciertos factores de transcripción que son sensibles al estado redox.

Cada vez son más numerosos los trabajos que destacan un papel señalizador de los ROS dependiendo del origen y nivel de ROS, su influencia puede variar a nivel celular o subcelular (Li, Jia, and Trush 2016; Schieber and Chandel 2014; Zhang et al. 2016). Los ROS producidos en un determinado orgánulo en cantidades lo suficientemente pequeñas como para ser confinados pueden modular vías de señalización discretas en esa localización. Por otro lado, los ROS que se producen en cantidades suficientemente grandes como para que se difundan a lo largo de la célula pueden funcionar como coordinadores de la señalización global en la célula (Nathan and Cunningham-Bussel 2013). En este último ejemplo, los ROS de origen mitocondrial (mROS) por su abundancia podrían coordinar la señalización redox celular. Además, se ha reportado que un número creciente de proteínas mitocondriales residen en el núcleo y actúan como mediadores de la comunicación directa entre mitocondrias y núcleos. Estas proteínas pueden desempeñar funciones similares en ambos compartimentos o tener actividades distintas. La importación de proteínas mitocondriales responde a la actividad mitocondrial y esto representa un punto regulatorio clave para determinar el equilibrio entre la localización mitocondrial y nuclear y modular

respuestas de supervivencia, crecimiento, proliferación y/o diferenciación (Monaghan and Whitmarsh 2015).

Los niveles netos de ROS pueden variar entre tipos celulares y pueden ser una característica intrínseca de éstos (Lopez-Fabuel et al. 2016), pero son moléculas muy dinámicas que están asociados con el estado metabólico de la célula. Por tanto, es lógico que puedan modular una señalización específica con una gran relevancia biológica. La mayoría de las moléculas de señalización intracelular son proteínas que ayudan a retransmitir la señal dentro de la célula, ya sea generando segundos mensajeros o activando a la siguiente proteína de señalización o efector de la vía. Los segundos mensajeros son pequeñas sustancias químicas (por ejemplo, AMP cíclico, Ca^{2+} o diacilglicerol) que se generan al activarse el receptor por un estímulo extracelular o intracelular y se difunden lejos de su fuente, extendiendo la señal a otras partes de la célula. Por ejemplo, la fosforilación/defosforilación juega un papel predominante en la señalización celular, y muchos trabajos recientes sugieren un papel crítico para las reacciones redox, mediadas por ROS, en la transducción celular bajo ciertas condiciones (Li et al. 2016; Schieber and Chandel 2014; Zhang et al. 2016).

Como se mencionó anteriormente, debido a la presencia de varias defensas antioxidantes, es poco probable que los pequeños aumentos transitorios en los niveles de ROS causen lesiones significativas a las células (Conrad et al. 2013; D'Autréaux and Toledano 2007; Li et al. 2016). En cambio, tales aumentos transitorios en los niveles de ROS pueden cumplir una función de señalización, en el que los ROS actuarían como segundos mensajeros sobre proteínas reguladoras quinasas, factores de transcripción, para propagar una respuesta celular fisiológica. De esta manera se han descrito un papel señalizador de los ROS en respuestas como la proliferación y diferenciación celular, la supervivencia o coordinando la respuesta antioxidante (Kira M. Holmström and Finkel 2014). También se diferencia de la señalización redox, la modulación o regulación redox que se refiere a un proceso en el que los ROS alteran la actividad o función de las dianas moleculares sensibles a redox, sin actuar como segundos mensajeros, incluyendo todo tipo de biomoléculas, lípidos de la membrana plasmática o subcelulares, proteínas de señalización y algunas enzimas metabólicas como α -cetoglutarato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa, dando lugar a respuestas fisiológicas o fisiopatológicas (estrés oxidativo) de amplio espectro. Entre estas dianas destacan diversas vías de señalización por quinasas o fosfatasa y algunos factores de transcripción.

Entre las rutas dependientes de quinasas encontramos las quinasas activadas por mitógeno (MAPK, del inglés, *mitogen-activated protein kinases*), las cascadas de fosfatidilinositol 3-quinasa/AKT, la proteína quinasa C (PKC) u otras vías nodales de la señalización celular como Wnt/ β -catenin, Hedgehog, Notch (Görlach et al. 2015). Entre las PKCs existe una regulación directa e indirecta de su actividad a través de la oxidación de residuos Cys o bien de manera indirecta por intermediarios como la proteína tirosina-quinasa LCK que tras su activación por ROS es capaz de fosforilar un residuo tirosina entre el dominio regulador y el sitio activo de la PKC (Hardwick et al. 1995; Konishi et al. 2001). La oxidación directa y reversible del grupo tiol de los residuos Cys es común para diversas Tyr-quinasas y Ser/Thr fosfatasa, así se ha descrito que los ROS aumentan la activación de las quinasas MAPK, ERK y JNK y sus vías de señalización asociadas. Los ROS son capaces de modular las cascadas de señalización para la proliferación y la diferenciación celular (Abraham et al. 2009). También, a través de la oxidación reversible de residuos de Cys en las caspasas pueden modular la apoptosis (Circo and Aw 2010).

Entre los factores de transcripción que responden a ROS encontramos a los factor nuclear kappa-B (NF-κB), el principal regulador de la respuesta antioxidante celular NRF2 (del inglés, nuclear factor erythroid-2-related factor-2) o los genes de la familia del factor inducible por hipoxia (HIF-1α y HIF-2α del inglés, hypoxia-inducible factors), que coordinan una respuesta metabólica adaptativa a los niveles de oxígeno. Por su relación directa con el estado redox celular, nos centraremos en la señalización mediada por NRF2 (Sandberg et al. 2014a). Este factor de transcripción se encuentra en condiciones basales en el citosol formando un complejo con la proteína KEAP1 que va a ejercer un papel dual (del inglés, Kelch-like ECH-associated protein 1). Por un lado, KEAP1 actúa como sensor del estrés oxidativo y, por otro lado, funciona como un adaptador de sustratos permitiendo la interacción de NRF2 con la E3 ubiquitina ligasa culina 3 (CUL3) y que poliubiquitina a NRF2 para su degradación continua en el proteasoma (D'AuTréaux and Toledano 2007). Cuando los niveles de ROS se incrementan este complejo se desestabiliza permitiendo la traslocación de NRF2 al núcleo donde promueve la transcripción de una amplia batería de genes codificantes de enzimas antioxidantes (Taguchi, Motohashi, and Yamamoto 2011). Para ello, los múltiples grupos tiol presentes en KEAP1 son blancos directos de oxidación por ROS, por este motivo, KEAP1 actúa como sensor del incremento de ROS. La oxidación de los residuos Cys¹⁵¹, Cys²⁷³ y/o Cys²⁸⁸ de KEAP1 promueven el cambio conformacional del complejo KEAP1-Cul3-NRF2 que libera a NRF2.

5.3. Señalización redox en el sistema nervioso central.

En el SNC la regulación de NRF2 constituye otro ejemplo de compartimentación celular y colaboración astrocito-neurona (Dinkova-Kostova and Abramov 2015; Esteras, Dinkova-Kostova, and Abramov 2016; Hashimoto 2018; Merry and Ristow 2016; Neves Carvalho et al. 2017; Sandberg et al. 2014a; Taguchi et al. 2011). Muchos de los genes diana de NRF2 se caracterizan por la presencia en sus promotores de secuencias denominadas de respuesta antioxidante (ARE, del inglés, *antioxidant response elements*). Algunas de estos genes diana son la glutamato cisteína ligasa (GCL), el transportador MRP1 (del inglés, *multidrug resistance protein 1 transporter*) que ha demostrado participar en el transporte de glutatión o la γ -glutamilttransferasa (γ -GT). Entre otras respuestas, a través de la señalización de NRF2, la expresión coordinada de estas enzimas permite regular la biosíntesis del glutatión (GSx), su transporte y división extracelular en el dipéptido cisteína-glicina (Cys-Gly).

De nuevo en nuestro laboratorio, demostramos que las neuronas y los astrocitos expresan diferente actividad de la vía NRF2, de manera que las neuronas, al contrario que los astrocitos, presentan altos niveles de los represores KEAP1 y Cul3 que favorece la continua desestabilización de NRF2 (D. Jimenez-Blasco et al. 2015). Por tanto, la transcripción de los genes antioxidantes en las neuronas se reprime de manera continua, mientras que los altos niveles de NRF2 en los astrocitos justifican la labor antioxidante de este tipo celular. Estas diferencias en los niveles de NRF2 entre astrocitos y neuronas ayudan a la comprensión del acoplamiento existente entre el metabolismo y el sistema antioxidante desde un punto de vista celular en el SNC (Bolaños 2016; Fernandez-Fernandez et al. 2012). Los mecanismos implicados durante la neurotransmisión glutamatérgica excesiva es el mejor ejemplo para comprender este acoplamiento (ver **Esquema 1**). Ante esta situación de estrés las neuronas producen ROS, que contribuyen a la oxidación del glutatión (GSx), que pasa de su forma reducida (GSH) a la oxidada (GSSG). La oxidación por ROS del glutatión neuronal junto con la recolección del exceso de glutamato por parte de los astrocitos promueve la biosíntesis *de novo* de glutatión mediada por los astrocitos. Los altos niveles de NRF2 en los astrocitos favorecen la producción del dipéptido Cys-Gly. Las neuronas absorben Cys-Gly en forma de cisteína y glicina a través de la acción de la aminopeptidasa (APN) y glutamina a través del

exceso de glutamato que los astrocitos transforman de nuevo en glutamina (ver **Esquema 1**). Por tanto, la biosíntesis neuronal *de novo* de GSx depende del suministro de precursores de GSx por parte de los astrocitos. Posteriormente, las neuronas contribuyen decisivamente a la regeneración de GSH a través de NADPH, un proceso que depende de la desestabilización de PFKFB3 por APC/C-Cdh1 para poder dirigir el consumo de glucosa hacia la PPP con el que generar poder reductor (Almeida et al. 2004; Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009; Y. Zhang et al. 2014). Este direccionamiento del consumo de glucosa potencialmente causa una limitación para la generación de energía en las neuronas que es compensada por el soporte metabólico astrocítico. Este mecanismo es complementario al acoplamiento metabólico descrito entre astrocitos y neuronas durante la neurotransmisión glutamatérgica. Por tanto, la señalización de NRF2 explica la dependencia neuronal del apoyo astrocítico para mantener la homeostasis redox y completa el entendimiento de la cooperación metabólica astrocito-neurona (Bolaños 2016; Sandberg et al. 2014a).

6. Modelos animales para combatir y estudiar los efectos de los ROS.

De manera general podemos definir tres tipos de sistemas antioxidantes: 1) antioxidantes autocatalíticos que no requieren un sustrato reductor sino un ciclo entre los intermediarios de las reacciones de oxido-reducción (catalasa y superóxido dismutasas), 2) antioxidantes que se unen al glutatión a través de la glutatión reductasa con NADPH (glutaredoxinas y peroxidasas de glutatión), y 3) antioxidantes que combinan la reducción de la tiorredoxina través de la tiorreductasa con consumo NADPH (peroxirreductasas y tiorredoxinas). El interés por la biología redox y la contribución del estrés oxidativo al envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad ha propiciado el desarrollo de un gran número de modelos que modulan estos sistemas antioxidantes.

Los ratones que carecen de CAT no presentan un fenotipo mayor, aunque son más sensibles a los desafíos oxidantes y las mitocondrias aisladas también muestran una disminución en la respiración mitocondrial después de un trauma físico (Ho et al. 2004). Existen varios modelos deficientes de la expresión de las diversas SOD favorece la aparición de síntomas neurodegenerativos que parecen requerir la presencia de un daño previo (Conrad et al. 2013). También encontramos modelos de ratón para los 6 genes de peroxirredoxinas (*Prx*) que presentan los mamíferos y que afectan a diversas localizaciones celulares. Sin embargo, hasta ahora todos los modelos *knock-out* (KO) de *Prx* han demostrado ser viables sin alteraciones graves, aunque tienen sensibilidad a la acción de fuentes exógenas de ROS y algunos específicos como los ratones con KO de *PrxII* presentan un impacto en la plasticidad sináptica dependiente de la edad (Kim et al. 2011). Los modelos KO para *Gpx* no presentan fenotipo en condiciones basales aunque muestran hipersensibilidad a procesos de isquemia/reperfusión (Conrad et al. 2013). *GPx4* es la única isoforma de glutatión peroxidasa capaz de reducir los fosfatos de lípidos oxidados además del H₂O₂, la letalidad embrionaria (E7.5) en el KO constitutivo de este gen o en etapa adulta en modelos KO constitutivos (Yoo et al. 2012) han demostrado ser esencial para el desarrollo y supervivencia, mientras que la alteración específica de tejido de *GPx4* en ratones conduce a la neurodegeneración en hipocampo y córtex (Wirth et al. 2010). Otro antioxidante dependiente del glutatión son la familia de las glutatión reductasas (*Grx*), los estudios realizados con ratones KO de *Grx1* indican que no se trata de una función esencial ya que son viables y no muestran una mayor sensibilidad a la isquemia/reperfusión (Ho et al. 2007). Otros modelos de antioxidantes esenciales como *Trx1* o *Trx2* o la γ -GCS producen letalidad embrionaria requiriendo enfoques específicos de célula para determinar

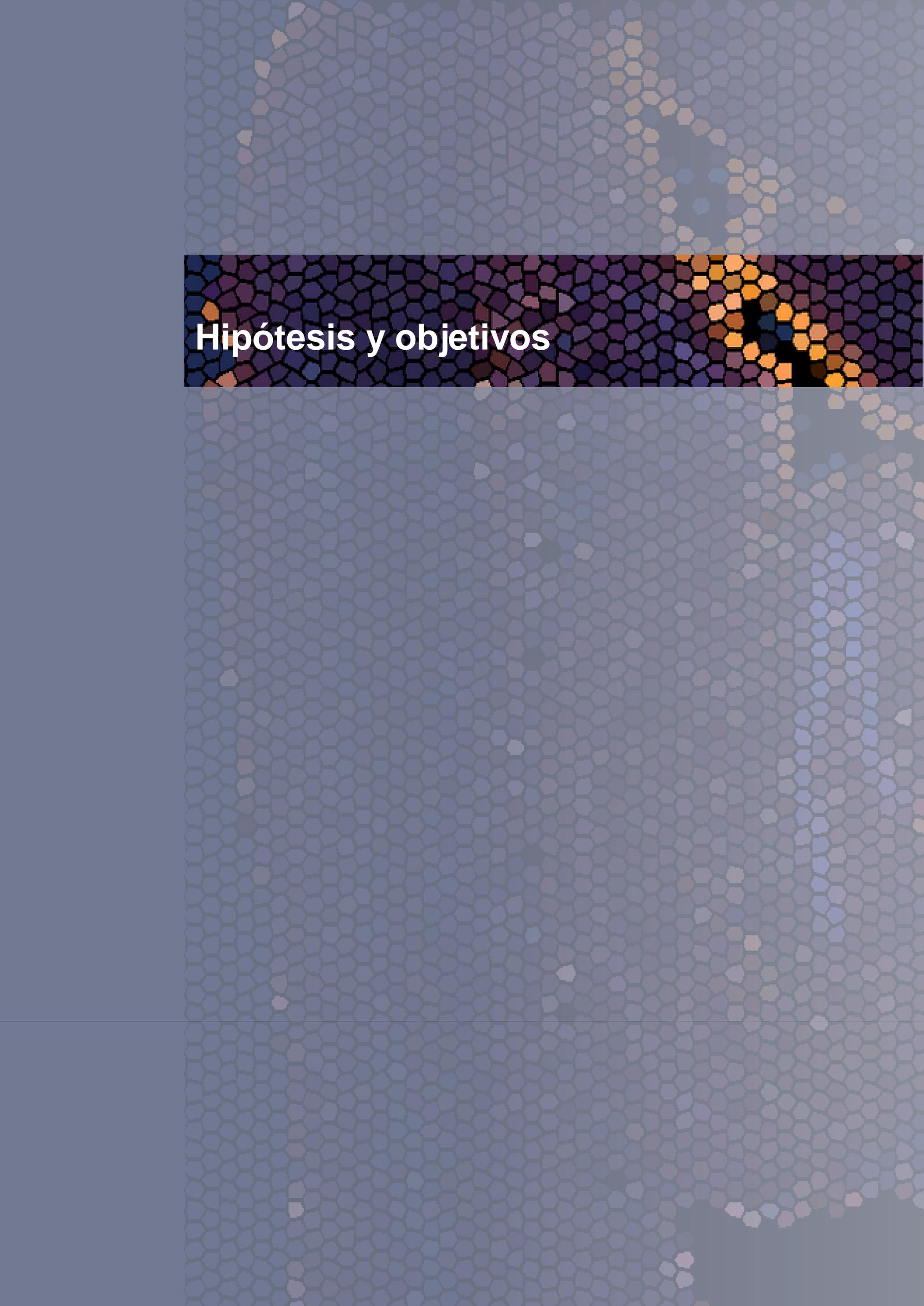
su papel en la proliferación y supervivencia neuronal durante el desarrollo y diferenciación (Conrad et al. 2013). En general, la ablación genética de algunos miembros del sistema redox antioxidante dependiente de tiorredoxina, muestra fenotipos obvios en el SNC o sistema nervioso periférico incluso funciones esenciales para el desarrollo embrionario, aunque muchos otros modelos no presentan una alteración clara o necesitan ser retados para la aparición de fenotipos patológicos.

No obstante, el gran número de modelos con este tipo de estrategia *knock-out* basan su estudio en el incremento de ROS, igual que lo hacen otros modelos que utilizan un incremento de ROS a través de una fuente exógena. Esta metodología, a pesar del interés que advierte de la importancia de la regulación redox, favorece el estudio de los efectos deletéreos de los ROS lo que puede enmascarar su posible efecto fisiológico o beneficioso. También encontramos en la bibliografía modelos que, al contrario, persiguen una reducción de los ROS fisiológicos, aunque no carentes de desventajas. Por ejemplo, la sobreexpresión de la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD o SOD2) disminuye eficientemente la cantidad de superóxido, pero aumenta la de peróxido de hidrógeno (Chen et al. 1998). Otros modelos persiguen directamente la reducción de H₂O₂ como la sobreexpresión de la *Prx3* (Matsushima et al. 2006), no obstante, la intervención del complejo peroxirredoxina/tiorredoxina requiere la intervención de NADPH y la regeneración del ratio NADPH/NADP⁺ tiene influencias metabólicas directas. Otra estrategia para la reducción de ROS mitocondriales (mROS) ha sido la sobreexpresión de una versión mitocondrial de la glutamato cisteína ligasa (mGCL) (Quintana-Cabrera et al. 2012) que a pesar de demostrar su eficiencia en la reducción de mROS la acción enzimática de GCL requiere el consumo de ATP, cisteína y glutamato, interfiriendo en el metabolismo celular. Otra manera eficaz para la reducción de ROS de una manera más neutra es la sobreexpresión de catalasa. Se ha generado un modelo de ratón que expresa una versión mitocondrial de la catalasa (mCAT) para reducir los niveles de mROS que ha demostrado que la reducción de ROS en este orgánulo celular tiene una influencia directa en la longevidad de los ratones que no ocurre tras la reducción de ROS en otros orgánulos como el núcleo o los peroxisomas (Schriner et al., 2005). A pesar de la relevancia de los resultados una de las desventajas de este modelo mCAT, y el resto de los modelos que sobreexpresan CAT en otros compartimentos celulares comparados en este estudio, es el desconocimiento del número de copias o el lugar de inserción del transgén en cada modelo analizado ni, por tanto, la influencia de la inserción en la expresión de genes colindantes lo que puede interferir en la interpretación de los resultados.

En esencia, este último apartado deja patente que se han desarrollado una gran variedad de modelos transgénicos en múltiples especies que han sido de gran interés para examinar el efecto del estrés oxidativo. Ciertamente, los ratones deficientes en enzimas antioxidantes son a menudo más susceptibles a las enfermedades relacionadas con la edad, mientras que los ratones que sobreexpresan las enzimas antioxidantes a menudo tienen un aumento en la cantidad de tiempo que pasan sin enfermedad, es decir, en la duración de su salud (Conrad et al. 2013). Los resultados con estos modelos son variables desde la letalidad embrionaria que se interpreta como que el sistema antioxidante es una red compleja y esencial, pero a veces redundante según los resultados de aquellos modelos que no presentan ningún efecto. Sin embargo, aunque la adición de un sistema antioxidante haya demostrado su eficacia en la mayoría de los modelos en situaciones de estrés, existe controversia y poca evidencia de que el estrés oxidativo en condiciones basales juegue un papel en la determinación de la esperanza de vida (Sanz 2016). Ambos tipos de modelo son de gran utilidad para entender los mecanismos que afectan el envejecimiento saludable y útiles en el descubrimiento de posibles dianas terapéuticas para mejorar la condición de

salud, que afectan especialmente al SNC y al cerebro como máximo representante de éste. No obstante, estos antecedentes sugieren que son necesarios nuevos modelos que ayuden a comprender la probable contribución de la señalización redox en el estado fisiológico cerebral con especial atención al papel astrocítico.

En resumen, esta introducción pretende recopilar que el estudio de la homeostasis redox debe tener en cuenta aspectos como 1) las fuentes celulares de producción de ROS, 2) las interacciones moleculares entre los ROS y las dianas moleculares en los sistemas biológicos que, según lo destacado, incluye a los componentes del sistema antioxidante pero también otras moléculas que reaccionan de forma más susceptible pero natural con los ROS, 3) las consecuencias fisiopatológicas y 4) fisiológicas del estado redox celular. Además, en el caso particular del cerebro, las diferencias en los niveles de ROS entre astrocitos y neuronas (Lopez-Fabuel et al. 2016) sugiere incluir en este paradigma un punto 5) que considere el origen celular de los ROS para conocer la implicación de los niveles fisiológicos intrínsecos a cada célula. Esto puede ser de gran relevancia para comprender su influencia funcional dada la compartimentación y colaboración celular existente en varios procesos destacados del metabolismo energético, el reciclaje o la defensa antioxidante en el SNC.



Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La alta demanda energética cerebral requiere una estrecha cooperación entre los tipos celulares que conforman este tejido, especialmente las neuronas y los astrocitos (Bélanger et al. 2011; Falkowska et al. 2015; Liu et al. 2017; Magistretti and Allaman 2015). Las características metabólicas de ambos tipos celulares son muy diferentes. Las neuronas, que dependen estrictamente de la fosforilación oxidativa mitocondrial para su función y supervivencia, utilizan sustratos fácilmente oxidables suministrados por los astrocitos, que dependen de la glucólisis. En consonancia con estas características, el trabajo de nuestro laboratorio demostró que en las neuronas la cadena de transporte de electrones mitocondrial está organizada para favorecer su eficiencia, mientras que en los astrocitos está menos ensamblada y es menos eficiente (Lopez-Fabuel et al. 2016). De esta manera, estas diferencias en la configuración de la cadena respiratoria explican que la generación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ROS) se mínima en las neuronas y es relativamente elevada en los astrocitos, donde los niveles de ROS son de hasta un orden de magnitud mayor. El hecho de que los astrocitos a pesar de su robusta defensa antioxidante tengan una abundante fuente natural de ROS mitocondriales (mROS), podría significar que al igual que ocurre en otros procesos de la fisiología habitual de las células neurales, puede existir una compartimentación de la señalización redox que explicaría las diferencias en los niveles endógenos de ROS entre astrocitos y neuronas.

Por tanto, una vez descifrado los mecanismos que favorecen las diferencias en los niveles endógenos de mROS entre las células neurales, ante la falta de explicación, en este trabajo nos proponemos estudiar su relevancia funcional. Por estos motivos, nos planteamos la hipótesis de que los altos niveles endógenos de mROS astrocíticos ejercen un papel fisiológico capaz de modular procesos celulares esenciales para la homeostasis de este tipo celular, así como su influencia sobre el tejido cerebral.

Objetivos

De acuerdo con los antecedentes descritos y la hipótesis de trabajo, para poder dilucidar si los altos niveles endógenos de mROS astrocíticos ejercen un papel fisiológico se plantean los siguientes **objetivos generales**:

- 1. Desarrollar un modelo experimental capaz de reducir eficientemente los niveles endógenos de mROS astrocíticos.** Para ello, se generará un nuevo modelo de ratón *knock-in* constitutivo que exprese mito-Catalasa (mCAT), con el que estudiar su eficiencia *in vitro* para reducir los niveles endógenos de los mROS en cultivos primarios de astrocitos.
- 2. Investigar el papel fisiológico de los mROS endógenos astrocíticos mediante la reducción de sus niveles.** Para ello, se estudiarán las consecuencias de la reducción de mROS en cultivos primarios de astrocitos, mediante el sistema mCAT, sobre los principales aspectos de la biología celular astrocítica.
- 3. Evaluar la influencia *in vivo* de la reducción de mROS astrocíticos más allá de los fenómenos intracelulares, en la colaboración astrocito-neurona, a nivel tisular y en aspectos más complejos como el comportamiento del ratón.** Para ello, se generará una versión *knock-in* condicional del modelo de ratón mCAT, para poder evaluar las posibles alteraciones cerebrales a nivel metabólico, anatómico y de comportamiento, tras la manipulación espacio-temporal *in vivo* de los niveles endógenos de mROS astrocíticos.

Por tanto, se plantea resolver los objetivos con un plan de trabajo jerárquico comenzando por estudiar aspectos moleculares y celulares de la biología redox, hasta estudiar fenómenos intercelulares, tisulares o respuestas complejas como la conducta animal.



Materiales y métodos

1. Protocolos de 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, sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. En la legislación española de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, donde se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Además, todos los protocolos realizados con los animales fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca. Los animales fueron criados en jaulas ventiladas individualmente en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (máximo 5 animales/jaula), en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (ciclo no invertido, fase de oscuridad 20:00 a 8:00). La humedad relativa ambiente de 45-65% y la temperatura de 20-25°C. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta sólida estándar (LabDiet® Picolab® Verified-751F, fórmula disponible *online*, en esencia las calorías de esta dieta proceden del 23 % de proteínas, 13 % de lípidos, 64 % de carbohidratos además de proporcionar vitaminas y minerales) y libre acceso al agua.

1.1. Generación del modelo de ratón knock-in mitoCatalasa (mCAT).

Para el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral, se generó un nuevo modelo de ratón transgénico que sobre-expresa una versión modificada de la enzima catalasa, dirigida específicamente al compartimento mitocondrial (mitoCatalasa, en adelante *mCat* o mCAT, para referirnos a la construcción genética o la proteína codificada, respectivamente). La construcción *mCat* fue una cesión del profesor José Antonio Enríquez Domínguez (CNIC; Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid). Esta construcción se trata de secuencia genética artificial, a nivel de nucleótido, diseñada para tener en cuenta la preferencia de codones para la especie ratón, no obstante esta secuencia codifica la proteína catalasa de ratón (número de acceso en NCBI Protein, [NP_033934.2](#)).

La enzima catalasa se compone de cuatro subunidades idénticas, cada una con su propio sitio catalítico en el centro de un grupo hemo. La catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en dos pasos. Una primera molécula de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se rompe formando un átomo de oxígeno que reacciona con el hierro del grupo hemo, y una molécula de agua, hasta que una segunda molécula de peróxido de hidrógeno se une, liberándose otra molécula de agua y oxígeno molecular. Esta construcción incluye además la secuencia genética en fase de 1) el péptido señal de localización mitocondrial de la subunidad VIII-A de la Citocromo c oxidasa (número de acceso en NCBI Protein, [NP_031776.1](#)) para dirigir la proteína codificada a este orgánulo y 2) un segmento de 12 codones del gen la hemaglutinina humana (HA) para utilizarse como marcador/*flag* exógeno y facilitar la detección de la proteína de fusión mCAT-HA. La generación del animal se llevó a cabo en la empresa especializada genOway (Lyon, Francia) de acuerdo con la petición de Juan Pedro Bolaños. Para obtener una expresión fuerte y ubicua de la construcción *mCat* se utilizó el promotor CAG (del inglés, *chicken-actin promoter/CMV enhancer*). Además, entre el promotor y la secuencia de *mCat* se colocó un *cassette* de STOP transcripcional flanqueado por sitios *LoxP* (*mCat^{LoxP/+}*, en heterocigosis). Los sitios *LoxP* son sitios de reconocimiento específicos para la proteína Cre recombinasa (**Figura I**).

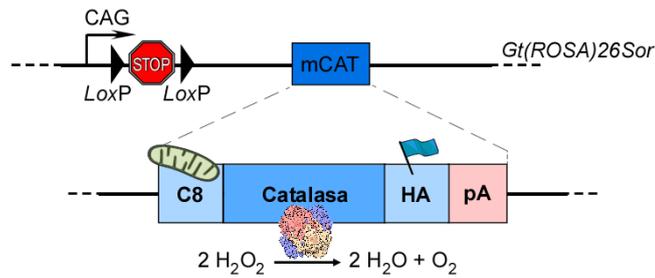


Figura I. Esquema elementos alelo mitoCatalasa condicional (floxeado) en el locus génico *Rosa26*.

Para la generación de este nuevo modelo de ratón, una sola copia de la construcción *mCat* se insertó en células madre embrionarias (ES, del inglés, *embryonic stem*) mediante recombinación homóloga en el locus *Rosa26* en ratones con fondo genético C57BL/6. Las propiedades de este locus génico, con estructura relajada y abierta de la cromatina, hacen de éste el sitio ideal de inserción para la generación de modelos *Knock-in* con patrones de expresión ubicua. Sin embargo, se ha reportado que los ratones homocigóticos *Rosa26 Knock-in* pueden mostrar parámetros de reproducción anormales. En nuestro caso, esta última consideración no ha sido relevante debido a que todos los experimentos se han realizado en heterocigosis para el alelo *mCat*. Dada la constante cinética de esta proteína, independientemente de la cantidad de proteína, la sobreexpresión de una única copia de la proteína mCAT es suficiente para neutralizar grandes concentraciones de H_2O_2 . De esta manera generamos un modelo *knock-in* condicional ($mCat^{LoxP/+}$), silente para la proteína de fusión mCAT en ausencia de actividad Cre recombinasa.

1.1.1. Diseño de cruces para la obtención de modelos mCAT de interés.

La principal versatilidad de desarrollar un modelo *knock-in* condicional está en la posibilidad de cruzar con otras líneas de ratón que expresan la proteína Cre recombinasa para ejercer un control espacio-temporal que nos permite obtener potencialmente múltiples modelos de sobreexpresión de mCAT específicos de tejido o tipo celular. Para este trabajo de tesis doctoral se han generado 3 nuevas líneas de ratón a partir del modelo mCAT condicional ($mCat^{LoxP/+}$): una línea constitutiva que garantice la expresión ubicua de mCAT en todos los tejidos y otras dos célula-específica para expresar mCAT en el compartimento astrocítico y neuronal.

Modelo mCAT constitutivo (en adelante, mCAT). En este caso la generación de este modelo fue realizada también por la empresa genOway a partir del modelo mCAT condicional ($mCat^{LoxP/+}$) éstos se cruzaron con ratones CMV-Cre recombinasa (CMV-Cre/+ o Cre *deleter*) para eliminar el *cassette* de STOP y expresar constitutivamente la proteína de fusión mCAT en heterocigosis ($mCat/+$, en adelante ratones mCAT). Una pareja de parentales mCAT constitutivos en un fondo genético estable C57BL/6J fue proporcionada por la empresa genOway. Para nuestros experimentos *in vitro* con células mCAT, se diseñaron cruces de ratones heterocigóticos mCAT constitutivos ($mCat/+$) con ratones C57BL/6J (+/+), en la descendencia encontramos con la misma frecuencia genética hermanos de camada con genotipo $mCat/+$ (en adelante, mCAT) y +/+ (en adelante, WT del inglés, *wild type*) y estas condiciones se llevarán siempre en paralelo para los experimentos *in vitro* de este trabajo.

Modelo mCAT condicional astrocítico (en adelante, GFAP-mCAT). Para expresar el mCAT en astrocitos *in vivo*, se diseñaron cruces en nuestro laboratorio de los ratones condicionales mCAT ($mCat^{LoxP/+}$), con ratones que expresan una Cre recombinasa bajo el promotor del gen astrocítico GFAP

(del inglés, *Glial fibrillary acidic protein*) (GFAP-Cre^{ERT2}) (Hirrlinger et al. 2006). La proteína de fusión Cre^{ERT2} es una Cre recombinasa fusionada a una forma triple mutante del receptor de estrógeno (ER) humano que no se une a su ligando natural (17β-estradiol) en concentraciones fisiológicas, sino que es altamente sensible a concentraciones nM de un análogo sintético; tamoxifeno, o su forma activa 4-hidroxitamoxifeno. La proteína de fusión se mantiene inactiva en el citoplasma unida a proteínas *heat shock* (HSP, del inglés, *heat shock protein*). La administración de tamoxifeno libera la unión de CRE^{ERT2} a estas proteínas, permitiendo la acción nuclear para escindir regiones flaqueadas por sitios *LoxP*. El gen GFAP codifica una de las principales proteínas de filamentos intermedios de los astrocitos maduros. Se utiliza como marcador para distinguir los astrocitos de otras células gliales aunque, durante el desarrollo, también se ha caracterizado su expresión en progenitores neurales GFAP positivos pueden generar tipos específicos de neuronas durante la neurogénesis (Kriegstein and Götz 2003; Zhang and Jiao 2015). Teniendo en cuenta este hecho, como este modelo GFAP-mCAT es un modelo *knock-in* condicional e inducible, la activación de la actividad recombinasa dependiente de tamoxifeno se realizó a las 8 de vida de los ratones, para reducir las probabilidades de activar el sistema a edades tempranas donde los nichos de células progenitoras neurales y la neurogénesis es más activa. De la progenie de estos cruces se seleccionaron los genotipos *GFAP-Cre^{ERT2}/+; mCat^{LoxP}/+* y *+/+; mCat^{LoxP}/+*; para administrar intraperitonealmente, a las 8 semanas de edad, 100 µl de una solución de tamoxifeno de 20 mg/ml en una mezcla de aceite de girasol y etanol (9:1, en volumen) durante cinco días consecutivos con el fin de activar la actividad de la Cre recombinasa en astrocitos *in vivo*. Los ratones resultantes, es decir, *GFAP-Cre^{ERT2}/+; mCat^{LoxP}/+* (en adelante, GFAP-mCAT) y hermanos de camada *+/+; mCat^{LoxP}/+* (en adelante, Control) se utilizaron a partir de los 8 meses de edad, especificando la edad exacta en cada apartado correspondiente. La caracterización del evento de recombinación forma parte de los *resultados* de este trabajo.

Modelo mCAT condicional neuronal (en adelante, CamK-mCAT). Para expresar el mCAT en neuronas *in vivo*, se diseñaron cruces en nuestro laboratorio de los ratones condicionales mCAT (*mCat^{LoxP}/+*), con ratones que expresan una Cre recombinasa bajo el promotor del gen neuronal *CamKIIa* (del inglés, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha*) (Jackson Laboratory, B6N.Cg-Tg (Camk2a-Cre)T29-1Stl/J). En este caso, de la progenie de estos cruces se seleccionaron los genotipos *CamK2a-Cre/+; mCat^{LoxP}/+* (en adelante, CamK-mCAT) y *+/+; mCat^{LoxP}/+* (en adelante, Control CamK). En este caso la activación del evento de recombinación es endógena, por tanto, autónoma. El patrón de expresión de este promotor se distribuye a lo largo del cerebro incluyendo la corteza, el hipocampo, el núcleo estriado y otras estructuras. De nuevo estos animales se utilizaron a partir de los 8 meses de edad y ventana de edad será especificada en cada apartado necesario.

El trabajo con líneas isogénicas, como la C57BL/6J, nos permite reducir enormemente la variabilidad interindividual al igualar el fondo genético y ser portadores de las mismas variantes alélicas. No obstante, la influencia del ambiente, las dietas, modificaciones epigenéticas, diferencias en la estabulación son factores para tener en cuenta como fuentes de variabilidad y reproducibilidad entre laboratorios. Esto afecta a medidas de parámetros discretos como el peso, niveles de metabolitos, hormonas, entre otros, pero también a aspectos más complejos como el comportamiento animal.

Por todo ello, los experimentos *in vivo* se realizaron comparando hermanos de camada de los genotipos de interés y, a su vez, utilizando distintas camadas de diferentes cruces para confirmar la reproducibilidad de los resultados. Dado que los cruces de las líneas GFAP-mCAT o CamK-mCAT proceden

de cruces con líneas isogénicas con el mismo fondo genético C57BL/6J, podemos asumir que los controles seleccionados de estas líneas que comparten el genotipo (+/+; *mCat*^{LoxP}/+) podrían ser genéticamente idénticos, aunque asumimos que puedan existir ligeras diferencias entre ellos seleccionadas previamente en las líneas GFAP-Cre y CamK-Cre. Por este motivo, ambas líneas tienen su contrapartida control llevada en paralelo bajo las mismas condiciones. Este hecho es especialmente relevante independientemente del aspecto genético en el caso de la línea GFAP-mCAT ya que como ha sido mencionado, los animales control y GFAP-mCAT, fueron tratados igualmente con tamoxifeno para eliminar inferencias derivadas de su farmacológica.

2. Genotipado de ratones mCAT.

2.1. Extracción de ADN genómico de biopsias de cola de ratón.

Los distintos genotipos involucrados en los ratones transgénicos de este estudio fueron examinados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *polymerase chain reaction*) de fragmentos específicos de transgén a identificar. Para ello, se utilizó una biopsia de la cola de los ratones, con precauciones adecuadas para evitar la contaminación cruzada entre muestras, en el momento del destete (~20 días de vida) o bien tras sacrificar al animal en un experimento, para su re-genotipado. En el caso de los cultivos primarios individualizados la muestra se extrajo de las colas de neonatos o embriones. Para la digestión del tejidos, cada muestra se trató con 100 µl de una solución de lisis (Buffer TEN: 50mM Tris pH 7,5; 5 mM EDTA pH 8,0; 100mM NaCl previamente preparado suplementado en el momento con 1 mM DTT y 0,5 mM espermidina y 1:50 (v/v) de proteinasa K) y se incubaron en un termobloque a 55 °C con agitación durante la noche. Posteriormente, el lisado se inactivó a 100 °C durante 5 minutos para evitar la acción de la proteinasa K. Finalmente, las muestras se centrifugan a máxima velocidad durante 1 minuto para decantar el detrito tisular.

2.2. Protocolos de identificación genotípica de los ratones mCAT.

A continuación, se indican los diferentes protocolos de amplificación mediante PCR para identificar la presencia de los alelos *mCat*, Cre-recombinasa y la mutación en el gen de la Nicotinamida (NAD) nucleótido transhidrogenasa (Nnt del inglés, Nicotinamide nucleotide transhydrogenase).

2.2.1. Detección del alelo *mCat* en animales constitutivos y condicionales. Análisis del evento de recombinación en modelos condicionales.

Las condiciones óptimas para esta PCR requieren trabajar con 30 ng de ADN. Se diseñó una estrategia capaz de detectar la inserción de la construcción *knock-in* en el locus *Rosa26*. Por tanto, estos *primers* nos permiten reconocer tanto la versión floxada (flanqueada por sitios *LoxP*) como aquella construcción en la que se ha eliminado el *cassette* de STOP, como la de los animales mCAT constitutivo. Las secuencias de los oligonucleótidos (*primers*) para el genotipado los alelos del *mCat*, en ratones constitutivos o condicionales, fueron: 5'-CGATTTGTGGTGTGTTTATGTAACATACTAATCTGTCTGG-3', 5'-CTCCAAAGTCGCTGCTGAGTTTTTATCA-3' y 5'-GCAGTGAGAGAGTAGTACTACCACCATGAGTAGTCC-3' *primers* 1, 2 y 3, respectivamente (**Figura IIa**). Para poder analizar el evento de recombinación por Cre recombinasa en un tejido donde no todas las células sufren la escisión, fue necesario diseñar otros oligonucleótidos capaces de detectar la pérdida, en aquellas células diana, del *cassette* transcripcional STOP flanqueado por sitios *LoxP* dentro de la construcción *knock-in*. En este caso, los *primers* utilizados fueron:

5'-AGCCTGCTGCTAACCATGTTTCATGCC-3', 5'-GAGCCATCTCATCAGTAAAACTACACGTCCTG-3' y 5'-CTTACTCCACACAGAGGGCATAGTTGTCTGC-3' primers 4, 5 y 6, respectivamente (Figura IIb).

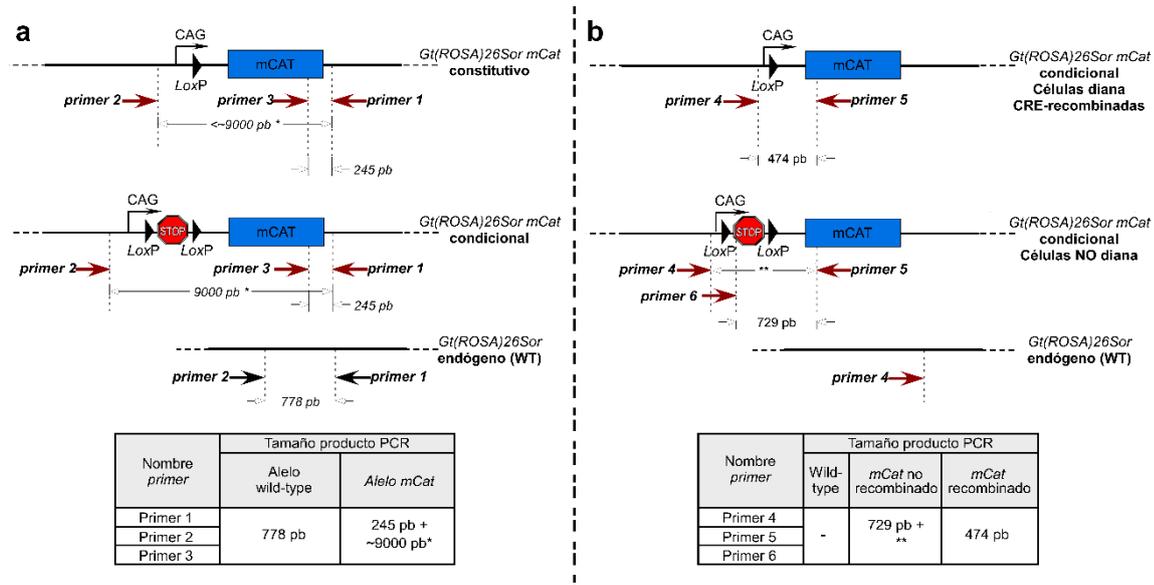


Figura II. Protocolos de PCR para reconocimiento alelo *mCat* recombinado y no recombinado.

En ambos casos, se utiliza a una concentración de oligonucleótidos final de 15 pmol, y utilizamos 2,6 U de una *Taq* polimerasa *Hot Start* (requiere una activación por calor para iniciar su actividad). Las condiciones de amplificación para estas PCRs son: Fusión 94 °C (5 min) + amplificación x 35cicos [94 °C (30 seg) - 65 °C (30 seg) - 68 °C (3 min)] + extensión 68 °C (5min). Las concentraciones finales de los componentes de la PCR fueron: 0,5 mM dNTPs mix (Roche), 0,6 μM de *mCat* primers (Sigma) (excepto *mCat-KI-Rosa* se usa a 0,3 μM) 0,02 U/μl de *Taq* polimerasa *Hot Start* (Biotools) y 1X de buffer de reacción con MgCl₂. Los productos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2,5-3%.

2.2.2. Detección de la construcción *Cre-recombinasa*.

Para caracterizar la progenie de las líneas GFAP-mCAT y CamK-mCAT se analizaron los alelos para los transgenes *mCat* y *Cre*. De la descendencia tan sólo se estudiaron 2 de los 4 genotipos posibles, descartando aquellos ratones que no portan el alelo *mCat*. Consideramos que la selección de estas dos variantes genéticas es la forma óptima para evaluar únicamente la influencia de mCAT, descartando con esta comparación estudiar posibles efectos derivados de un goteo (en inglés, *leaky*) por la recombinación espontánea en ausencia de CRE recombinasa. Las muestras de los ratones portadores del alelo *mCat* se examinaron para amplificar una región de 270 pb del transgén *Cre*, independientemente del promotor astrocítico (GFAP) o neuronal (CamK). Los oligonucleótidos para este protocolo son *Cre-For* 5'-GCATTTCTGGGGGATTGCTCTTA-3' y *Cre-Rev* 5'-CCCGGCAAAACAGGGTAGTTA-3'. Como esta PCR detecta la presencia/ausencia del transgén *Cre*, estos oligonucleótidos se combinaron con los de un control interno para detectar falsos negativos. Utilizamos el gen endógeno *Snca*, con los siguientes oligonucleótidos *Snca-For* 5'-ATCTGTCCTTCTTGACAAAGC-3' y *Snca-Rev* 5'-AGAAGACCAAAGAGAGCAAGTGACA-3', que amplifican una banda de 150 pb. Las condiciones de amplificación para estas PCRs son: Fusión 94 °C (5vmin) + amplificación x 35cicos [94 °C (1 min)- 58 °C (1 min)- 72 °C (1 min)] + extensión 72 °C (10 min). Las concentraciones finales de los componentes de la PCR fueron: 0,2 mM dNTPs mix (Roche), 0,5 μM de *Cre* primers (Sigma), 0,25 μM de *Snca* primers (Sigma),

0,008 U/ μ l de Taq polimerasa *Hot Start* (Biotools) y 1X de buffer de reacción con MgCl₂. Los productos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2,5-3%.

2.2.3. Detección de la mutación *Nnt*.

De acuerdo con el protocolo extraído de (Nicholson et al. 2010) la variante alélica del gen *Nnt* se evaluó mediante PCR con 3 oligonucleótidos que discriminan entre el alelo mutante o alelo silvestre (WT): *Nnt-COM* 5'-GTAGGGCCAACCTTTTTCTGCATGA-3', *Nnt-WT* 5'-GGGGCATAGGAAGCAAATACCAAGTTTG-3' y *Nnt-MUT* 5'-GTGGAATTCCGCTGAGAGAGAACTCTT-3'. El oligonucleótido común "COM" participa en la amplificación de los alelos tanto mutantes como WT *Nnt*^{B6J}, mientras que los "WT" y "MUT" son específicos para los alelos WT (579 pb) y mutante (743 pb) de la *Nnt*^{B6J}, respectivamente (**Figura III**). Estocásticamente, en los animales heterocigotos se obtiene una banda adicional débil (~1 kb) que facilita el reconocimiento de un fondo mixto. Las condiciones de amplificación para estas PCRs son: Fusión 95 °C (5 min) + amplificación x 35ciclos [95 °C (45 seg) - 58 °C (30 seg)- 72 °C (45 seg)] + extensión 72 °C (5 min). Las concentraciones finales de los componentes de la PCR fueron: 0,67 mM dNTPs mix (Roche), [1,0 μ M *Nnt-COM*, 0,33 μ M *Nnt-WT*, 0,67 μ M *Nnt-MUT*] (Sigma), 0,008 U/ μ l de Taq polimerasa *Hot Start* (Biotools) y 1X de buffer de reacción con MgCl₂. Los productos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1-2%.

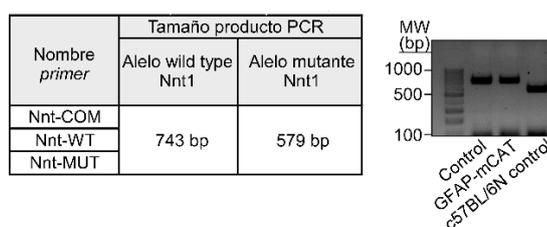


Figura III. Análisis por PCR de la mutación en el gen *Nnt*.

3. Cultivos celulares primarios.

Independientemente del tipo celular cultivado, todos los cultivos celulares se mantuvieron en incubadores especializados para mantener las condiciones de temperatura a 37 °C y una atmósfera del 5% de CO₂. Toda la manipulación previa a la obtención de muestras para experimentación se realizó en cabinas de flujo laminar, para garantizar la esterilidad ambiental durante el desarrollo del cultivo. No obstante, todos los medios de cultivo y soluciones se suplementaron de forma preventiva con 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycinina y 0,25 μ g/ml anfotericina B (Sigma Aldrich), para evitar contaminaciones bacterianas o fúngicas. La renovación del medio de cultivo, salvo requerimientos excepcionales, se realizó con una frecuencia de 3 días y a menudo 24h antes de aquellos ensayos que requieren una medida dependiente de la concentración de los compuestos del medio para obtener una medida reproducible en cultivos confluentes.

3.1. Tratamientos, inhibición de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial.

Se realizaron experimentos inhibiendo la CTE mitocondrial para evaluar una máxima producción de ROS y un incremento glucolítico en estas condiciones. Los tratamientos consistieron en rotenona (5 μ M), antimicina A (2,5 μ M) y oligomicina (6 μ M) disueltas en *stocks* concentrados preparados en etanol y almacenados a -20 °C. En estos tratamientos se utilizó el vehículo (etanol) en paralelo para distinguir el efecto de los inhibidores.

3.2. Protocolo de cultivo primario de astrocitos de ratón, de neonatos individualizados.

Los experimentos realizados con células en cultivo primario, en el caso de tratarse de diferentes genotipos, se realizaron con células obtenidas de hermanos de camada llevando las condiciones a comparar en paralelo y eliminando influencias como las derivadas de los parentales, reduciendo así un factor importante de variabilidad. Por este motivo, se diseñaron cruces entre ratones C57BL/6J silvestres (+/+) y ratones mCAT constitutivo (*mCat/+*), sin tener en cuenta el sexo de cada portador. Este cruce nos garantiza estadísticamente la misma proporción de descendientes con genotipo +/+ (en adelante WT, del inglés, *wild type*) y *mCat/+* (en adelante, mCAT). Los neonatos (0-24h) descendientes de estos cruces se fueron procesados individualmente dado su genotipo desconocido, constituyendo cada animal un cultivo individual. La disgregación celular hasta el sembrado de las células primarias se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, según el protocolo previamente descrito (Almeida and Medina 1998). En primer lugar, tras la decapitación, las cabezas se lavaron con etanol al 70% y la resección del cerebro se realizó con ayuda de pinzas y microtijeras quirúrgicas. Posteriormente, se diseccionó el cerebro descartando cerebelo y bulbos olfatorios hasta aislar la región cortical de interés. Se eliminó el exceso de sangre y las meninges con ayuda de un papel absorbente estéril. El tejido una vez limpio se fragmentó con un bisturí estéril y se le añadió una solución de disgregación (Solución "EBSS" Earle's Balanced Salt Solution (NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 1,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ -2H₂O 1,01 mM, glucosa 4 mM, rojo fenol 10 mg/l suplementado con albúmina 0.3% (p/v) y DNasa tipo I 20 µg/ml, pH 7.2, tripsina 0,025% p/v) para su tripsinización a 37°C en un baño termostatzado durante 10 minutos agitando frecuentemente para evitar la decantación del tejido. La digestión enzimática se detuvo añadiendo un 10% de suero bovino fetal, antes de una centrifugación del tejido (500 x g 5 minutos) en una microcentrífuga a temperatura ambiente.

Una vez decantado el tejido disgregado enzimáticamente, este *pellet* tisular se resuspendió en una solución de disgregación carente de tripsina (EBSS + DNasa + albúmina) para su disgregación mecánica mediante pipeteo con una pipeta Pasteur previamente siliconada y flameada en su punta para reducir el efecto cizalla y favorecer la individualización de las células de la masa tisular. En el caso de los cultivos individualizados, se realizaron aproximadamente 9 pasos por pipeta por muestra con pipetas independientes y un volumen de 1,5 ml. El sobrenadante se dejó decantar durante al menos 5 minutos para separar el detrito tisular y se recuperó el volumen que contiene la suspensión celular. Este proceso se repitió 2 veces para incrementar el rendimiento, hasta lograr ~3ml de suspensión celular por muestra de cerebro. Finalmente, la suspensión celular individual se sembró en frascos estériles de cultivo celular de 75 cm² en 20 ml de medio DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con un 10% de suero bovino fetal. Se realizaron al menos 2 cambios de medio hasta el día 7 *in vitro* (DIV7) que los frascos se agitaron dentro del incubador durante al menos 12h para eliminar aquellas células débilmente pegadas y enriquecer el porcentaje de astrocitos fuertemente pegados. A DIV8, una vez conocido el genotipo de los astrocitos de cada frasco, el sobrenadante se descartó y los astrocitos adheridos se despegaron con tripsina. Posteriormente, los astrocitos de un mismo genotipo se agruparon en una única suspensión celular para ser re-sembrados (100.000 células/cm²) en las placas óptimas para cada experimento según el requerimiento de células totales. De esta manera, astrocitos WT y mCAT procedentes de distintos animales de una misma camada se cultivaron paralelamente bajo las mismas condiciones. En el DIV11, según lo establecido en las condiciones de co-cultivo con neuronas que serán revisadas más adelante, el medio fue reemplazado por el medio definido Neurobasal A suplementado

con 2% B27 MAO (*minus antioxidant*), 2 mM de glutamina, 5.5 mM glucosa, 0,22 mM de piruvato. Se realizó un control de glucosa en el DIV13 con un glucómetro (medidor Glucocard G+, Angelini) para ajustar la concentración de glucosa a 5,5 mM. Los experimentos con astrocitos fueron realizados a DIV15.

3.3. Protocolo de cultivo primario de neuronas corticales de ratón.

Los cultivos de neuronas primarias de ratón se realizaron con hembras gestantes de ratones C57BL/6J (+/+). Los embriones fueron extraídos a día 15,5 de gestación. En este caso al no haber diferencia en el genotipo una vez extraídos la región cortical con ayuda del material quirúrgico previamente descrito se siguieron las indicaciones del protocolo de astrocitos con volúmenes ajustados (según los descrito en (Almeida and Medina 1998)). Tras la disgregación enzimática y mecánica hasta conseguir células individualizadas. La suspensión celular se resuspendió en medio de cultivo definido Neurobasal A suplementado con 2% B27 MAO (*minus antioxidant*), 2 mM de glutamina, 5.5 mM glucosa, 0,22 mM de piruvato. Las células progenitoras se sembraron a una densidad de $2,5 \cdot 10^5$ células/cm² o a $1,8-2,0 \cdot 10^5$ células/cm² (para ensayos de inmunocitoquímica) en placas de poliestireno, previamente tratadas con poli-D-lisina a 15 µg/ml (Sigma-Aldrich).

3.4. Protocolo de co-cultivo de astrocitos y neuronas corticales.

Para obtener el co-cultivo astrocitario-neuronal, las células se obtuvieron de acuerdo con los protocolos previamente descritos haciendo coincidir el DIV0-1 del cultivo de neuronas con el DIV8 del cultivo de astrocitos. En este caso el cultivo de neuronas se sembró directamente en las placas habilitadas para co-cultivo (Corning® Transwell® Inserts) previamente tratadas con poli-D-lisina. Paralelamente, esta misma jornada coincidiendo con el DIV8 del cultivo de astrocitos éstos fueron re-sembrados en insertos semipermeables (0,4 µm tamaño de poro, Corning). Pasados 3 días (DIV3 neuronas y DIV11 astrocitos) se renovó el medio Neurobasal A suplementado según lo descrito para los cultivos primarios neuronales y se colocaron los insertos que contienen los astrocitos sobre la placa con el cultivo de neuronas. La concentración de glucosa en el medio durante el co-cultivo se controló para ajustar la concentración de glucosa a 5,5 mM hasta el DIV7 de las neuronas, correspondiendo en DIV15 para astrocitos.

4. Protocolos para la separación y estudio de astrocitos y neuronas de cerebros de ratón adulto.

4.1. Separación de poblaciones adultas mediante citometría de flujo tras la inyección de AAVs-GFP célula específicos.

Para poder estudiar de forma independiente los astrocitos en cerebro adulto recurrimos a un sistema basado en la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) bajo e, control del promotor del gen GFAP (del inglés, *glial fibrillary acidic protein*), específico de astrocitos. Para ello, utilizamos virus adeno-asociados (AAVs, del inglés, *adeno-associated virus*) como vectores de la construcción GFAP-GFP. La elección de este tipo de virus ofrece ventajas frente al uso de lentivirus porque los AAVs al contrario que los lentivirus permanecen principalmente episómicos, sin necesidad de integración en el genoma lo que podría afectar a la expresión del transgén y de los genes colindantes al punto de integración.

La utilización de esta estrategia basada en AAVs para la infección de un tipo celular debe tener al menos dos factores en cuenta, primero el promotor que gobierna la expresión del gen deseado y segundo la cápside del AAV que define su capacidad infectiva (Hammond et al. 2017; Zegehnagen et al. 2016). Ambas elecciones, son críticas para lograr una buena eficiencia y precisión para dirigir la infección a los astrocitos. Para el diseño de estos experimentos contamos con la excelente experiencia y colaboración del Profesor Gilles Bonvento (École des Neurosciences de Paris Île-de-France). Utilizamos una versión corta del promotor GFAP, denominada gfa-ABC₁D (Lee et al. 2008), que con una longitud de 681 pares de bases (pb) GFAP tiene esencialmente el mismo patrón de expresión que el promotor GFAP (2210 pb), y una actividad dos veces mayor. Por tanto, es muy apropiado si se quiere lograr una gran expresión y para aplicaciones donde el tamaño del ADN codificado por el AAV es limitante. Por otro lado, la elección de la cápside del virus hemos destacado que es importante para definir la especificidad de infección del virus, este hecho también es de vital importancia a la hora de elegir la vía de administración. En nuestro caso, como se mencionará más adelante, elegimos una administración intravenosa que nos obliga a utilizar cápsides capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Chan et al. 2017). En este trabajo, utilizamos la cápside AAV-PHP.eB que es una modificación del serotipo AAV10 que ha demostrado una transducción eficaz del sistema nervioso central mediante administración intravenosa (Chan et al. 2017). Por tanto, los virus utilizados en este trabajo para la expresión de GFP específicamente en astrocitos, se denominan AAV-PHP.eB-gfa-ABC₁D-GFP.

La inyección de AAV-PHP.eB-gfa-ABC₁D-GFP se realizó en ratones Control y GFAP-mCAT adultos (14

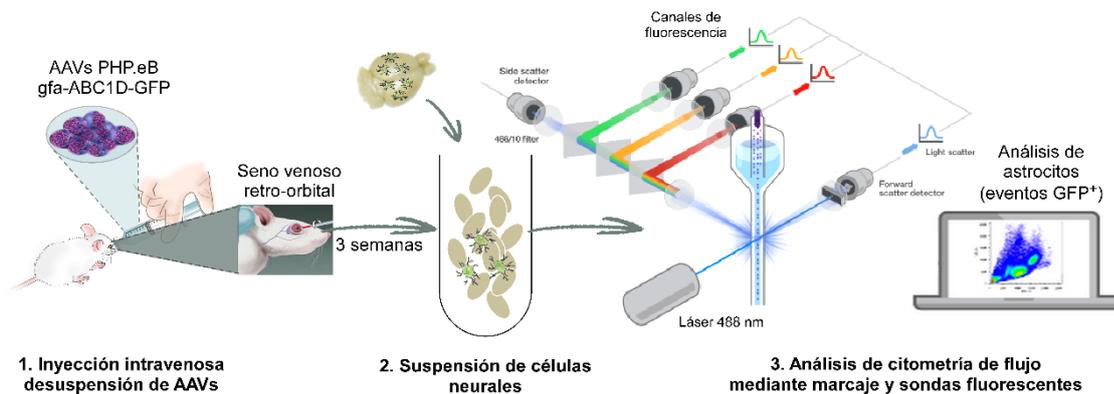


Figura IV. Representación del protocolo para la separación de poblaciones neurales aisladas de ratones adultos mediante citometría de flujo tras la inyección de AAVs-GFP célula-específicos.

meses) mediante administración intravenosa, a través del seno retro-orbital (**Figura IV**). Para ello, los ratones fueron brevemente anestesiados con sevoflurano (Sevorane. AbbVie, España) al 6% para su iniciación, seguido de ~3% 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, España) y un vaporizador (InterMed Penlons Sigma Delta, Reino Unido). En el seno venoso retro-orbital se administró una volumen 50 µl de una solución de PBS que contenía 0,001% de Pluronic® F-68 (Sigma-Aldrich) y 5 x 10¹⁰ genomas virales de AAV-PHP.eB-gfa-ABC₁D-GFP. La administración intravenosa es técnicamente compleja en el ratón adulto y este abordaje es una alternativa útil, y menos propensa a errores, que la inyección de la cola o de las venas temporales para la administración de soluciones no tumorigénicas (Yardeni, Eckhaus, and Morris 2011). La duración total del procedimiento por ratón fue de menos de 10 minutos, incluyendo la anestesia y la recuperación. Tres semanas después de la infección,

se extrajeron los cerebros para obtener una suspensión celular individualizada mediante tripsinización y resuspensión mecánica suave similar a la descrita en los apartados de *cultivos celulares primarios*. Esta suspensión celular fue incubada con MitoSox[®] y MitoProbe[™] DiIC₁(5), siguiendo los protocolos que se detallarán más adelante para evaluar los niveles de ROS mitocondriales y el potencial de la membrana mitocondrial, respectivamente, en células GFP⁺ (astrocitos) mediante citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences) (**Figura IV**).

4.2. Aislamiento y separación mediante métodos inmuno-magnéticos.

Para el aislamiento de células de cerebro de ratones adultos mediante este método, el tejido cerebral se disoció mediante el kit comercial de disociación del cerebro del ratón adulto (Miltenyi Biotec, #130-107-677). Este Kit ha sido desarrollado para una obtención rápida, delicada y eficaz de suspensiones unicelulares de cerebros adultos teniendo en cuenta las necesidades especiales de las células cerebrales y su sensibilidad durante la disociación. Este protocolo requiere el sistema optimizado gentleMACS[®] que asegura una disociación mecánica suave y un alto rendimiento de células viables basado en una combinación de disgregación enzimática (basada en tripsina y papaína) y mecánica por efecto cizalla en tubos individuales a 37°C. En nuestro caso, realizamos una puesta a punto para sustituir el uso del disociador gentleMACS[®] por una disgregación manual basada en los métodos tradicionales, descritos para tejidos de neonatos y/o embriones en el apartado de *cultivos celulares primarios*. Dados los requerimientos de las células de cerebro adulto, la disgregación se llevó a cabo con los tiempos y soluciones del protocolo comercial. Posteriormente, la suspensión celular homogénea se procesó, de acuerdo con el protocolo comercial de Miltenyi Biotec, para la eliminación del detrito celular y la eliminación de células sanguíneas. El detrito celular se consigue con un paso de centrifugación isopícnica de 2 fases con el que se consigue una tercera fase correspondiente al detrito. Por su parte, la lisis de eritrocitos es una etapa opcional que se ha optimizado para no afectar al resto de células de la suspensión. Ambos pasos, son de vital importancia para la purificación celular posterior dado el alto contenido en mielina del tejido adulto y por la interacción de los eritrocitos en pasos posteriores de reconocimiento antigénico. El rendimiento en este punto es heterogéneo, sobre todo debido al paso de la formación de la fase de detrito, en un rango de 5×10^6 to 5×10^7 por cerebro adulto.

Una vez lograda, una suspensión homogénea de células neurales individualizadas adultas las separaciones de poblaciones celulares adultas se realizó utilizando Tecnología MACS[®], por ejemplo, aislamiento de astrocitos utilizando el Kit MicroBead Anti-ACSA-2, ratón (#130-097-678), aislamiento de neuronas usando el Kit de Aislamiento de Neuronas, ratón (#130-098-752). La Tecnología MACS[®] está basada en el reconocimiento antigénico mediante anticuerpos específicos asociados a partículas (MACS MicroBeads) de tamaño nanométrico, que se separan mediante un alto gradiente magnético en columnas de empaquetamiento, logrando un aislamiento celular delicado con un marcaje celular mínimo.

El aislamiento de astrocitos se trata de una separación positiva, ya que los anticuerpos asociados a partículas magnéticas reconocen antígenos de superficie específicos de este tipo celular (ACSA-2, del inglés, *astrocyte cell surface antigen-2*, clon IH3-18A3, Miltenyi Biotec). De acuerdo con Miltenyi Biotec, el porcentaje de astrocitos ACSA-2 positivos difiere según la edad del ratón y la región cerebral debido a la expresión diferencial del antígeno ACSA-2. Por otro lado, el aislamiento y purificación neuronal se trata de una separación negativa, ya que el reconocimiento inmuno-magnético se realiza sobre el resto de la

población neural mediante un coctel de anticuerpos que reconocen marcadores no neuronales, para eluir por discriminación una fracción neuronal intacta.

Sendos tipos de muestra; astrocitos y neuronas, se utilizaron para un análisis transcriptómico de las células neurales de ratones adultos. La **Figura V** muestra la confirmación de la identidad de las fracciones aisladas por inmunotransferencia tipo *western blot* contra marcadores neuronales (MAP2) o astrocíticos (GFAP) (ver apartado *anticuerpos*), así como, el análisis de la cantidad e integridad (RIN, *RNA integrity*) del ARN obtenido de estas muestras mediante el sistema de electroforesis automático para el análisis de material genómico, 2100 Bioanalyzer (Agilent) realizado en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca). Los esquemas de este método de separación se muestran como parte de los *resultados*, en los apartados correspondientes.

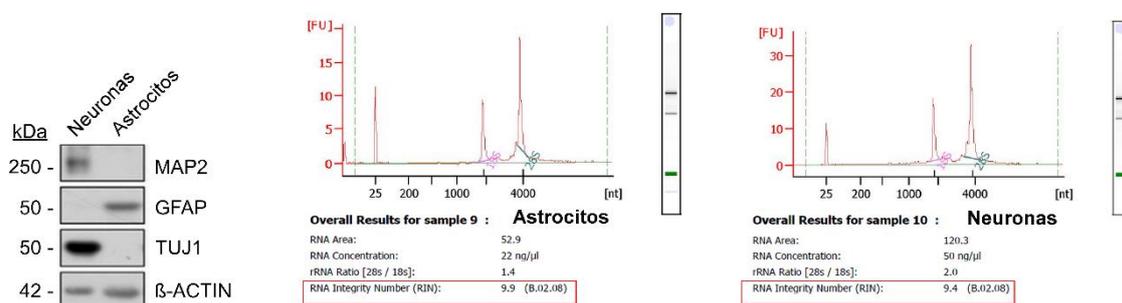


Figura V. Caracterización de la identidad y calidad del ARN obtenido de las poblaciones de astrocitos y neuronas aisladas de ratones adultos mediante métodos inmuno-magnéticos.

5. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Muchos de los trabajos que sugieren una intervención de los ROS, consideran los ROS como una sola entidad y utilizan sondas inespecíficas propensas a los artefactos experimentales para evaluar sus niveles. Por ejemplo, el diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) ha sido ampliamente utilizado para la medición de ROS, pero esta sonda reacciona de manera no específica con muchos tipos de radicales libres que se producen de forma ubicua, además de su propensión a auto-oxidarse (Kalyanaraman et al. 2012). Otra sonda habitual es el pHyper para la detección de H₂O₂, en este caso ha resultado ser sensible al pH desaconsejándose su uso (Erard, Dupré-Crochet, and Nüße 2018; Kalyanaraman et al. 2012). Por ello, aunque la investigación de los ROS está avanzando parte de la evolución está supeditada al avance técnico que sigue sujeto a múltiples limitaciones, sobre todo para aplicaciones *in vivo*. En nuestro trabajo hemos utilizado distintas técnicas para medir distintos tipos de ROS, así como, conseguir una mayor robustez de nuestros resultados. A continuación, los siguientes apartados explicamos en detalle cada sonda o método utilizado para facilitar la mejor interpretación de los resultados.

5.1. Detección de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) mediante Amplex Red®.

Para la detección de la producción de H₂O₂ hemos utilizado la sonda comercial fluorescente Amplex® Red (Invitrogen™ Molecular Probes™, Thermo Fisher Scientific, Ref. A12222). La determinación se realizó sobre células sembradas en placa de 96 pocillos o sobre mitocondrias aisladas en fresco (5 μg de proteína). La sonda fluorescente Amplex® Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) no penetra en el interior celular y se evalúa su oxidación a resofurina (7-Hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona) en el medio, donde reacciona de manera específica con el H₂O₂ de origen celular con una estequiometría 1:1 (**Figura VI**). La

medida de la cinética de oxidación de Amplex® Red se puede extrapolar como medida de la liberación de H_2O_2 al medio de cultivo, derivada de la producción de H_2O_2 en el interior celular. Para ello, se utilizó una concentración final de $9,45 \mu\text{M}$ Amplex® Red preparado en medio KRPG (del inglés, *Krebs Ringer Phosphate Glucose*: NaCl 145 mM; Na_2HPO_4 5,7 mM; KCl 4,86 mM; CaCl_2 0,54 mM; MgSO_4 1,22 mM; glucosa 5,5 mM; pH 7,35) suplementado con peroxidasa de rábano (0,1 U/ml).

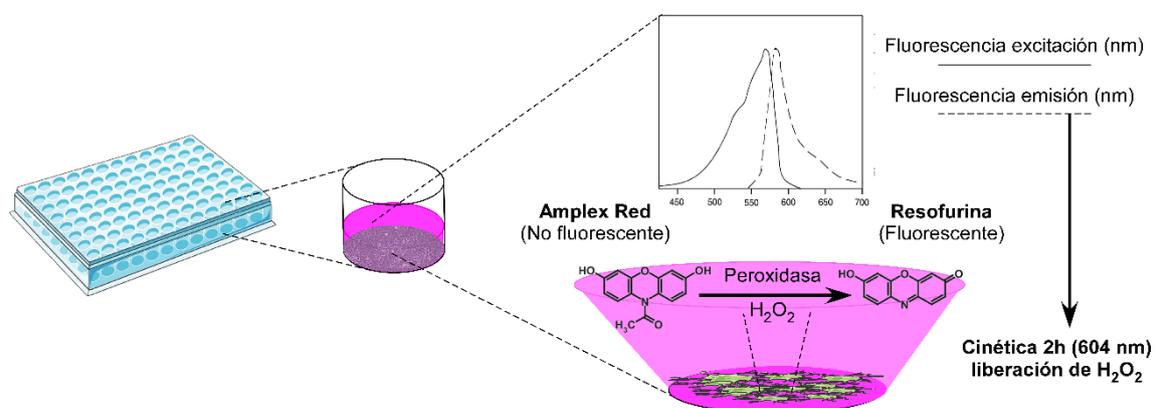


Figura VI. Determinación de cinética de liberación de H_2O_2 mediante la evaluación de fluorescencia derivada de la sonda comercial Amplex® Red en lector de placas.

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. Los parámetros de fluorescencia para esta sonda son una longitud de onda de 530-560 nm para la excitación y detección de emisiones de fluorescencia a ~ 590 nm, o para absorbancia a ~ 560 nm. Se calculó la cinética de liberación de H_2O_2 en la λ_{em} 604 nm y la concentración se calculó mediante la utilización de estándares de peróxido de hidrógeno de concentración conocida (rango 0-10 μM). No obstante, la comparación de datos absolutos extraídos de diferentes experimentos en condiciones similares demostró variabilidad intrínseca entre distintos usos de un mismo *stock* de la sonda o distintos *stock* de ésta. Por este motivo, la representación de los datos se analizó comparando la diferencia de valor en unidades arbitrarias según el número de veces (*fold*) con respecto a la condición control, a la que asignamos el valor de referencia 1 o 100.

5.2. Determinación *in vitro* de H_2O_2 como medida de la actividad enzimática de la catalasa.

Otros métodos clásicos para la determinación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) acoplan su capacidad oxidativa a la monitorización de moléculas cuya oxidación puede seguirse mediante colorimetría (Heinzel et al. 1992; Quintana-Cabrera et al. 2012). De esta manera, basándonos en la capacidad de la enzima catalasa para eliminar H_2O_2 , se determinó la actividad de la catalasa mitocondrial (mCAT) en muestras de mitocondrias aisladas de astrocitos (WT o mCAT).

Para ello, se incubaron muestras mitocondriales (5 μg de proteína) con distintas concentraciones de H_2O_2 exógeno (25, 50 y 100 μM). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μl de tampón fosfato (0,1 M), pH 7,4, durante 0, 5, 10, 15 y 20 minutos. Las reacciones se interrumpieron con la adición de HCl (37% de concentración final (vol/vol)). Posteriormente, se añadieron $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ (3,2 mM) y KSCN (180 mM). El Fe^{2+} de la solución de incubación se oxida con H_2O_2 en Fe^{3+} que reacciona con SCN^- , para formar el complejo de color naranja FeSCN^{2+} , que absorbe la luz a una longitud de onda de 492 nm. La acumulación de este compuesto es proporcional a la cantidad de H_2O_2 en la muestra. Tras 10 minutos de incubación en oscuridad se determinó la absorbancia a 492 nm en las distintas muestras y tiempos de

reacción con H_2O_2 exógeno especificados, utilizando un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Fisher). La concentración del H_2O_2 residual en cada una de las condiciones de concentración y tiempo testadas se calculó mediante una curva estándar de concentraciones conocidas de peróxido de hidrógeno.

5.3. Detección de anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) mediante MitoSOX™.

Para determinar los niveles de anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) producidos a nivel de la cadena de transporte de electrones mitocondrial utilizamos la sonda comercial MitoSOX™ Red (Invitrogen™ Molecular Probes™, Thermo Fisher Scientific, Ref. M36008). Este reactivo, derivado del bromuro de etidio (BrEt), es rápidamente permeable a las células vivas y contiene un grupo catiónico que lo dirige selectivamente a las mitocondrias. En el interior de estos orgánulos, el indicador MitoSOX™ se oxida por la acción del superóxido, pero no por otras especies de oxígeno y/o nitrógeno. Las modificaciones de su molécula no reducen la capacidad intercalante del BrEt, así la sonda una vez oxidada se une al ADN mitocondrial, lo que facilita la detección de su fluorescencia (λ_{em} 580 nm) en el interior celular.

El citómetro de flujo nos permite evaluar simultáneamente distintos fluoróforos en una misma muestra gracias a sus distintos canales de fluorescencia (FL) que filtran distintos rangos de longitud de onda para un mismo evento analizado. Así, la fluorescencia de la sonda MitoSOX™ (canal rojo, FL-3) puede determinarse a su vez en subpoblaciones de eventos previamente seleccionados en otros canales (FL) del citómetro. Esta capacidad nos permitió evaluar los niveles de anión superóxido exclusivamente en una subpoblación astrocítica, de manera independiente del resto de eventos de una suspensión compleja de células de un disgregado de cerebro adulto. Para ello, previamente la subpoblación de interés se discriminó mediante la expresión selectiva de la proteína verde fluorescente (GFP^+ , del inglés *green fluorescent protein*) que se filtró en el canal verde (FL-1) del citómetro FACScalibur (BD Biosciences) (**Figura VII**, continuación de **Figura IV**).

Para su determinación la sonda MitoSOX™ se incorporó en cultivos primarios de astrocitos pegados (Día 15 *in vitro*) o en una suspensión celular de células neurales extraídas de cerebro adulto, durante 30 minutos en las mismas condiciones de incubación del cultivo celular (temperatura a 37 °C y una atmósfera del 5% de CO_2) a una concentración final de 2 o 3 μM , respectivamente, en tampón HBSS (Hank's Balanced Salt Solution: NaCl 134,2 mM; KCl 5,26 mM; KH_2PO_4 0,43 mM; NaHCO_3 4,09 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,33 mM; glucosa 5,44 mM; HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico) 20 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 mM; pH 7.4). Posteriormente, se lavó el exceso de sonda y las células se tripsinizaron para el seguimiento de los niveles de fluorescencia mediante citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences, canal FL-3). Los valores de intensidad se expresan en unidades arbitrarias según el número de veces (*fold*) con respecto a la condición control, a la que asignamos el valor de referencia 1 o 100.

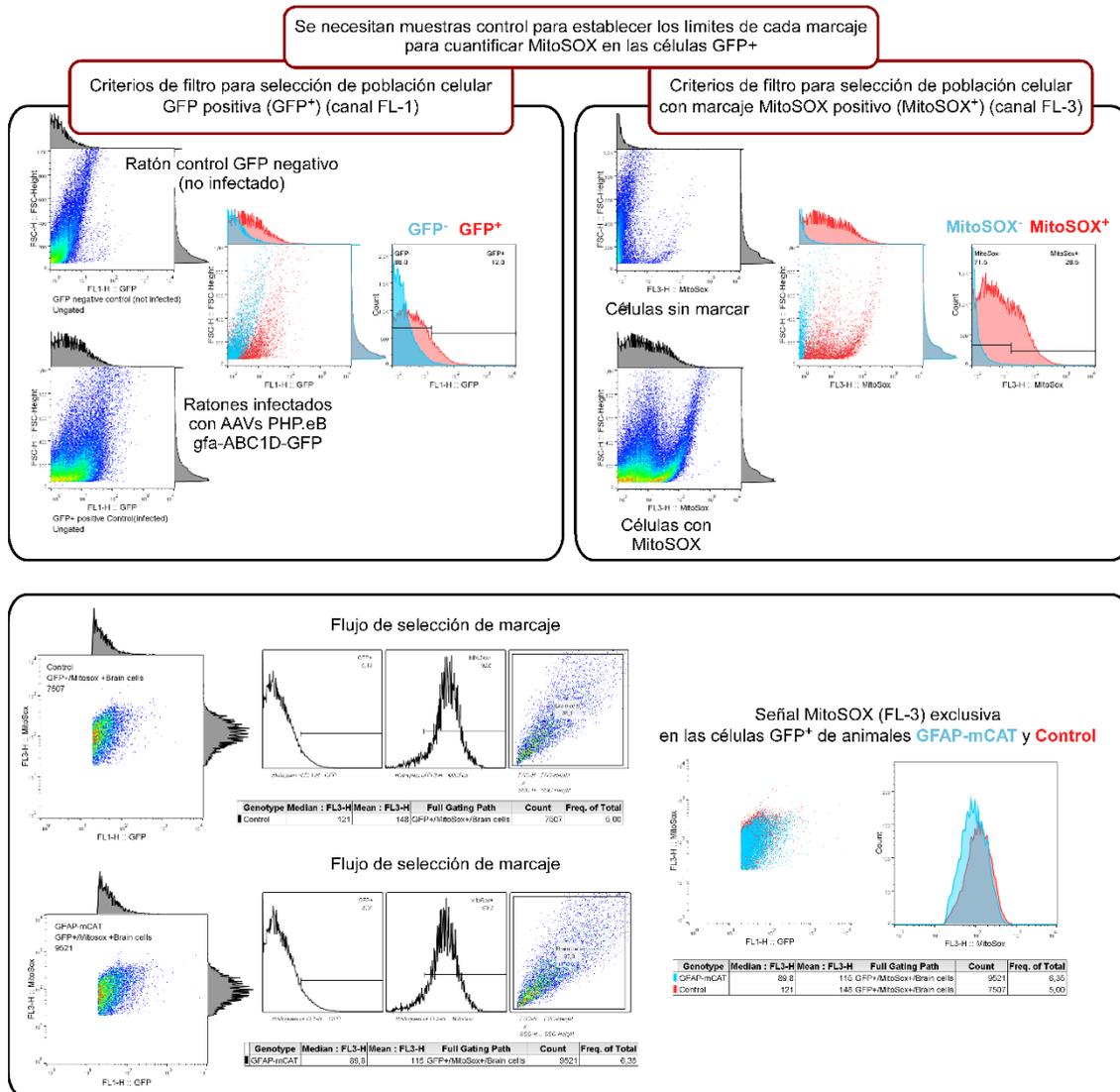


Figura VIII. Esquema del flujo de trabajo para la cuantificación de la señal de MitoSOX™ en suspensiones celulares aisladas de cerebros de ratones adultos, GFAP-mCAT y Control previamente infectados con AAV-PHP.eB-gfa-ABC1D-GFP, para evaluar las diferencias en los niveles basales de especies reactivas de oxígeno mitocondiales (mROS) exclusivamente en astrocitos.

6. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante MitoProbe™ DiIC₁(5).

Para determinar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) utilizamos la sonda comercial MitoProbe™ DiIC₁(5) (Invitrogen™ Molecular Probes™, Thermo Fisher Scientific, Ref. M34151) detectada mediante citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences). El colorante de tipo cianina sensible al potencial de membrana DiIC₁(5) (yoduro de 1,1',3,3,3',3'-hexametilindodicarbo-cianina), penetra en el citosol de las células eucariotas y se acumula gracias a su carácter catiónico principalmente en orgánulos con potenciales de membrana activos, produciendo una fluorescencia de color rojo lejano (λ_{ex} 638 nm, λ_{em} 658 nm). La intensidad de fluorescencia de DiIC₁(5) disminuye con la disminución del potencial de la membrana mitocondrial, por eso a su medición se acopla al tratamiento con el agente desacoplante mitocondrial CCCP (cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona). Posteriormente, el valor

correspondiente al $\Delta\Psi_m$ se obtiene de la diferencia de potencial obtenido antes y después del tratamiento con CCCP.

Para su determinación, los cultivos de astrocitos recién tripsinizados o una suspensión celular de células neurales extraídas de cerebro adulto (**Figura IX**, continuación de **Figura IV**) se incubaron con la sonda MitoProbe™ durante 30 minutos (en agitación, temperatura a 37 °C) a una concentración final de 40 o 60 nM, respectivamente, en tampón fosfato salino (PBS: NaCl 136 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄·2H₂O 7,8 mM; KH₂PO₄ 1,7 mM; pH 7,4). Posteriormente, el seguimiento de los niveles de fluorescencia se realizó mediante citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences, canal FL-4) en condiciones basales, y cada muestra una vez analizada se trató con CCCP (10 μ M) para volver a ser analizada tras 15 minutos de tratamiento. Los valores de $\Delta\Psi_m$ para cada muestra se calculan de la diferencia de intensidad detectada en basal sustrayendo la intensidad de esa misma muestra tras el tratamiento con CCCP. Los valores de $\Delta\Psi_m$ se expresan en unidades arbitrarias según el número de veces (*fold*) con respecto a la condición control, a la que asignamos el valor de referencia 1 o 100.

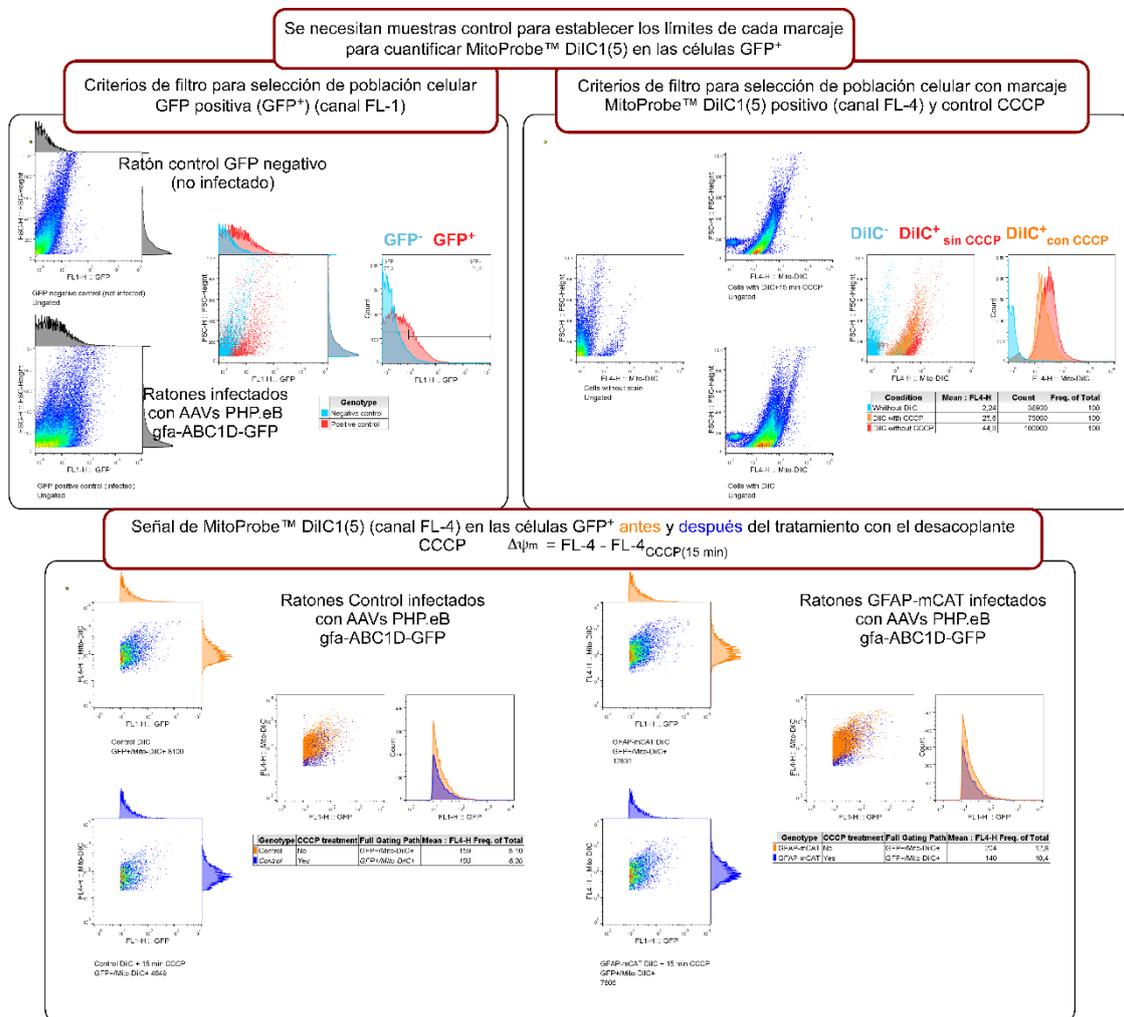


Figura IX. Esquema del flujo de trabajo para la cuantificación de la señal de MitoProbe™ DiIC(5) en suspensiones celulares aisladas de cerebros de ratones adultos, GFAP-mCAT y Control previamente infectados con AAV-PHP.eB-gfa-ABC1D-GFP, para evaluar las diferencias en los niveles basales de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) exclusivamente en astrocitos.

Esta determinación se realizó en paralelo con los experimentos de medición de ROS mediante MitoSOX™ en cultivos de astrocitos y en células disgregadas de cerebros adultos, para asegurar que las diferencias observadas en la intensidad del indicador MitoSOX™ no se deben a diferencias en su incorporación a favor del $\Delta\Psi_m$.

7. Determinación de daño oxidativo al ADN.

Estudiamos en astrocitos en cultivo primario la presencia de huellas de daño en el ADN relacionadas con estrés oxidativo (Wang et al. 2018). El método fluorescente K-assay® (Kamiya Biomedical Company, Cat. No. DN-001, también Calbiochem® OxyDNA) nos permitió detectar residuos de 8-oxoguanina (anti-8-oxoG-FITC) en el ADN mediante citometría de flujo en células fijadas y permeabilizadas. Esta modificación del nucleótido oxidado 8-oxiguanosina, es uno de los principales aductos inducidos en el ADN mediante daño oxidativo y constituye una importante fuente de mutaciones, como la sustitución de timina por guanina y citosina por adenina (transversión, G-C a T-A) (Wang et al. 2018). Se utilizó un tratamiento agudo con H₂O₂ (100 μ M, 15 min) como control positivo de la medición de daño oxidativo para definir el punto máximo de una escala de unidades arbitrarias. Se siguieron las instrucciones del kit, para ello, los cultivos de astrocitos se tripsinizaron para su fijación y permeabilización utilizando la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron con la solución de lavado del kit K-assay® y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos con el anticuerpo anti-8-oxoG conjugado FITC. Las muestras se volvieron a lavar antes del seguimiento de la intensidad de fluorescencia del isotiocianato de fluoresceína (FITC, λ_{Ex} 495 nm | λ_{Ex} 515 nm) mediante citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences) en el canal FL-1.

8. Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas específicas.

8.1. Electroforesis desnaturalizante y transferencia tipo Western blot.

La obtención de extractos proteicos totales para Western blot se realizó después de lavar las células con PBS y lisándolas en tampón RIPA (del inglés, radioimmunoprecipitation assay buffer, SDS al 1 %, EDTA 0,5 M, TritonTx-100 al 1 % v/v, NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 10 mM a pH 7,0), incluyendo inhibidores de proteasas y fosfatasa s: aprotinina 50 μ g/ml, leupeptina 50 μ g/ml, inhibidor de tripsina extraído de la soja 50 μ g/ml, TLCK 100 μ M, NaF 50 mM, orto-vanadato sódico 1 mM, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 100 μ M, N-p-tosil-L-fenilamina clorometil cetona (TPCK) 100 μ M, fenantrolina 1 mM y pepstatina A 50 μ g/ml. Los extractos se recogieron en hielo e inmediatamente se hirvieron durante 5 minutos seguidos de otros 5 minutos en hielo, repetido hasta 3 veces. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 13000 x g durante 10 minutos. La concentración de proteínas totales se determinó en el sobrenadante mediante el kit basado ácido bicinconí nico (BCA, Thermo Scientific™ Pierce™), el cual genera una reacción colorimétrica detectable a 562 nm, la concentración de los lisados se estableció en base a estándares de concentración conocida de albúmina.

Los extractos de proteínas (20-100 μ g) separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (solución de acrilamida/bis-acrilamida 29:1; BioRad Laboratories) ajustando el porcentaje de los geles al peso molecular de la proteína de interés. Para el seguimiento de los pesos moleculares, utilizamos el marcador comercial PageRuler™ Plus (Thermo Scientific™) para un rango de 10-250kDa. Las proteínas se separaron mediante un sistema de electroforesis vertical (MiniProtean-3®, BioRad Laboratories). Posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF (Hybond®, Amersham Biosciences)

y se bloquearon durante 1 h con leche al 5% (p/v) en TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 al 0,1% v/v; pH 7,5). Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (ver apartado *anticuerpos*) en una solución de TTBS suplementado con BSA al 2 % (p/v), a 4 °C durante toda la noche.

Tras la incubación con el anticuerpo primario las membranas se lavaron durante 5 min con TTBS al menos 3 veces. Posteriormente, las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h con leche al 2 % en TTBS en presencia del anticuerpo secundario correspondiente, según la especie de origen del anticuerpo primario, conjugado con peroxidasa de rábano. Finalmente, las membranas se incubaron con el reactivo de quimioluminiscencia SuperSignal™ West Dura (Thermo Scientific™) o WesternBright ECL HRP (Advansta) y se expusieron a películas de autorradiografía (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm), que se escanearon para su análisis. Los resultados mostrados son representativos de al menos 3 repeticiones con muestras biológicamente independientes, la cuantificación mostrada cuando corresponda se realizó empleando el software FIJI (ImageJ). Los valores corresponden a un ratio, tras normalizar las señales obtenidas para una determinada proteína de interés por la abundancia de una proteína abundante (housekeeping) que sirve como control de carga interno.

8.2. Electroforesis en condiciones nativas.

Esta aproximación nos permite estudiar las proteínas de la cadena de transporte mitocondrial en su configuración nativa, evaluando así la ultraestructura de ésta. Las mitocondrias aisladas de cultivos primarios de astrocitos se solubilizaron con digitonina (4 µg/ µg). Las muestras de mitocondria solubilizada (10-30 µg) se cargaron en presencia de 1/10 de tampón de carga (Serva-Blue G 5%; ácido 6-aminohexanoico 1M) para proporcionar carga negativa a la muestra, debido al color de este compuesto esta técnica también recibe el nombre de electroforesis nativa azul (BNGE, del inglés, *blue native electrophoresis*). Utilizamos geles nativos comerciales con un gradiente del porcentaje de acrilamida 3-12% (NativePAGE Novex Bis-Tris Protein Gels, Life Technologies). La electroforesis se realizó a 40 V durante toda la noche, empleando soluciones diferentes para las cámaras de ánodo y del cátodo (ánodo: Bis-Tris 50 mM pH 7; cátodo: tricina 50 mM; Bis-Tris/HCl 15 mM; pH 7) (Acín-Pérez et al. 2008b; Nijtmans, Henderson, and Holt 2002).

Por último, para la inmunodetección de las proteínas nativas mitocondriales se realizó la transferencia directa del gel de gradiente a membranas de nitrocelulosa con la finalidad de confirmar la organización de los complejos mitocondriales. Para ello, los geles se incubaron durante 20 minutos en agitación a 4 °C, en presencia de tampón de transferencia (10 mM NaHCO₃; 3 mM Na₂CO₃·10H₂O; pH 9,5-10). Posteriormente, la transferencia se realizó a 300 mA y 60 V durante 1 hora, continuándose la inmunodetección de las proteínas de interés de acuerdo con lo descrito en el apartado 8.1 (ver apartado *anticuerpos*).

9. Determinación de la actividad del complejo I de la cadena de transporte mitocondrial.

9.1. Medida de actividad en gel nativo.

La separación electroforética mediante BNGE no rompe las interacciones macromoleculares, lo que nos permite distinguir bandas discretas correspondientes a complejos individualizados y también, estructuras superiores correspondientes a la asociación múltiple de complejos (supercomplejos).

Además, las proteínas separadas en su configuración nativa no pierden su actividad. Esto nos permitió determinar la actividad del complejo I en los geles BNGE. Para ello, se lavaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 15-30 minutos con una solución fresca (Tris-HCl 0,1M pH 7,4; NTBZ (azul de nitro-tetrazolio) 1 mg/ml; NADH 0,14 mM) para revelar la actividad NADH deshidrogenasa. Para detener la reacción, se sustituyó la solución de reacción por agua destilada. La aparición de precipitados violetas derivados del NTBZ identifican los puntos de actividad NADH oxidasa, lo que nos permitió localizar el complejo I en los geles nativos de muestras mitocondriales. Una vez detenido la reacción, los geles fueron escaneados para su cuantificación por densitometría mediante el software FIJI (ImageJ). La señal detectada en cada carril se normalizó internamente tras realizar la transferencia directa (*apartado 8.2*) del gel de actividad en el que se reveló la abundancia de ATP-β como control de carga, que fue igualmente cuantificada mediante el software FIJI (ImageJ).

9.2. Medida espectrofotométrica de la actividad específica del complejo I.

Se determinó la actividad específica del complejo I en cultivos primarios de astrocitos. Para ello, las células se recogieron mediante tripsinización, se centrifugaron (500 x g, 5 minutos) y el sedimento se resuspendió en tampón fosfato potásico (KH₂PO₄ 0,1 M; pH 7). A continuación, en fresco, los astrocitos en suspensión se lisaron mediante 3 ciclos de congelación-descongelación alternando la inmersión en N₂ líquido con un baño termostatizado a 37 °C.

Para la determinación de la actividad específica del complejo I mitocondrial se emplearon de 100-200 µg de proteína celular. La actividad específica se determinó en tampón fosfato (KH₂PO₄ 20 mM; pH 7.2) con 8 mM de MgCl₂, en presencia de 2,5 mg/ml de BSA, 0.15 mM de NADH, y 1 mM de KCN a 30 °C. Para el cálculo de la actividad, se evaluaron diferencias en la absorbancia a 340 nm para el seguimiento del NADH, tras la adición de 50 µM de ubiquinona, y posterior adición de 10 µM de rotenona. La actividad en (nmol/min mg de proteína) se calculó según la siguiente fórmula:

$$Actividad = \frac{\Delta Abs/min}{\epsilon} \frac{V_{final}}{V_{muestra}} 1000 \frac{1 ml}{mg \text{ proteína}}$$

donde ϵ , representa al coeficiente de extinción molar de los sustratos con propiedades espectrofotométricas, midiendo la variación de su absorbancia (ΔAbs) ($\epsilon_{NADH} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ 1cm}^{-1}$).

Con el mismo principio, se evaluó paralelamente la actividad específica de la enzima citrato sintasa (CS). La actividad CS es constante de cada tipo celular, por lo que su medida se utilizó para normalizar la actividad específica del complejo I. Utilizamos 30-60 µg de proteína de las mismas muestras y la medida se realizó a 30 °C en presencia de 93 mM de Tris-HCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, 0,2 mM acetil-CoA, 0,2 mM DTNB y para los cálculos se evaluaron las diferencias en la absorbancia a 412 nm para el seguimiento del DTNB ($\epsilon_{DTNB} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ 1cm}^{-1}$).

10. Análisis de proliferación celular por incorporación de Bromo-deoxiuridina (BrdU).

Para evaluar la capacidad proliferativa de los cultivos primarios de astrocitos, cuantificamos la incorporación al ADN del compuesto bromo-deoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina. Su incorporación durante la fase de síntesis de ADN del ciclo celular se monitorizó mediante anticuerpos específicos fluorescentes conjugados con el fluorocromo APC (aloficocianina) (anti-BrdU-APC). Simultáneamente, los astrocitos se marcaron con la sonda 7-amino-actinomicina D (7-AAD). La sonda 7-

AAD es impermeable a la membrana plasmática, pero en células permeabilizadas este compuesto se une al ADN de doble cadena intercalándose entre los pares de bases nitrogenadas en regiones ricas en nucleótidos guanina y citosina, marcando los niveles de ADN total. El 7-AAD puede ser excitado a 488 nm con un láser de argón y emite a una longitud de onda máxima de 647 nm. Debido a estas características espectrales, el 7-AAD puede utilizarse en combinación con otros fluoróforos excitados a 488 nm como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la ficoeritrina (PE), además de la aloficocianina (APC).

Los cultivos de astrocitos primarios se incubaron con un pulso de 10 μ M de BrdU (BD Pharmingen™, APC BrdU Flow Kit, Ref. 552598) durante 90 minutos en medio de cultivo fresco en las condiciones habituales de cultivo celular (temperatura a 37 °C y una atmósfera del 5% de CO₂). Posteriormente, se lavó el exceso de sonda con PBS, los astrocitos se tripsinizaron, se fijaron y permeabilizaron con la solución BD Cytotfix/Cytoperm durante 15 minutos y se lavaron con la solución 1X BD Perm/Wash. Posteriormente, se añadieron a las células permeabilizadas y fijadas 10 μ l 7-AAD (BD Biosciences, ref 552598) por cada 10⁶ células para el marcaje de ADN total. El seguimiento de los niveles de fluorescencia se evaluó mediante citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences) en los canales de fluorescencia FL-3 (7-AAD) y FL-4 (BrdU-APC). Esta combinación, nos permite caracterizar las células que están sintetizando ADN (según la incorporación de BrdU) en los distintos puntos del ciclo celular (fases G₀,1, S o G₂/M) fácilmente distinguibles por la intensidad del marcaje con 7-AAD proporcional a la cantidad neta de ADN en cada evento. La incorporación de BrdU como medida de proliferación se representa como el ratio de las medias de la intensidad (en unidades arbitrarias) en los canales FL-4/FL-3.

11. Determinación de la apoptosis celular.

La apoptosis, o muerte celular programada, es un mecanismo regulador que limita el crecimiento por el cual las células pueden desencadenar su propia muerte en respuesta a señales extracelulares debido a daños irreparables en las células o el ADN. En el desarrollo del sistema neural, la apoptosis también desempeña un papel importante en la prevención del crecimiento excesivo de los distintos linajes celulares neuronales en el cerebro en desarrollo. La apoptosis es un proceso de varias etapas que incluye eventos celulares en etapas temprana, media y tardía que pueden ser detectados usando varios ensayos celulares, para este trabajo se utilizaron métodos diferentes que tienen en cuenta distintos aspectos de los eventos desencadenados en la señalización apoptótica.

11.1. Protocolo Anexina V-7-AAD.

El proceso de apoptosis se caracteriza por cambios morfológicos, incluyendo la pérdida de asimetría de la membrana plasmática, la descondensación del citoplasma y el núcleo, y la fragmentación de la cromatina nuclear. En células viables, existe una asimetría en la distribución de los fosfolípidos con colina, así fosfatidilcolina y esfingomielina, abundan en la monocapa externa, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina (PS) y distintos fosfatidilinositoles se observan predominantemente en la monocapa interna hacia el citosol. La exposición de PS en la superficie externa de la membrana celular se ha descrito como un evento primario en las células apoptóticas. La anexina V es una proteína anticoagulante vascular que posee una gran afinidad y especificidad por residuos de PS, lo que lo hace muy útil para el reconocimiento de los eventos apoptóticos (Vermes et al. 1995). No obstante, el marcaje con anexina V no es suficiente para diferenciar entre células necróticas y apoptóticas. Para ello, combinamos el marcaje de anexina V con la sonda nuclear impermeable a la membrana celular 7-amino actinomicina D (7-AAD)

(previamente descrito en el *apartado 10*). Por tanto, las células en apoptosis temprana excluyen el marcaje con 7-AAD, mientras que las células con una apoptosis más avanzada y/o necróticas serán positivas para el marcaje con 7-AAD debido a la falta de integridad de sus membranas, permitiendo la unión del 7-AAD al ADN.

Los cultivos primarios de astrocitos se tripsinizaron y se incubaron con una solución con anexina V, conjugada con el fluorocromo APC (aloficocianina), y 7-AAD en tampón de conjugación (HEPES 100 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se evaluaron 50.000-100.000 eventos mediante citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences), y las señales de la anexina V-APC y del 7-AAD se analizaron en los canales FL-4 Y FL-3, respectivamente para cuantificar el porcentaje de astrocitos apoptóticos (anexina V+/7-AAD-).

11.2. Protocolo de la actividad de caspasa-3 activa.

Otro componente central del proceso apoptótico lo constituye la cascada de enzimas proteolíticas llamadas caspasas. Las caspasas participan en una serie de reacciones que se desencadenan en respuesta a señales pro-apoptóticas y dan lugar a la ruptura de los sustratos proteicos, que promueven la descomposición de la célula. Estos eventos se consideran un punto intermedio en el proceso de muerte celular por apoptosis. Las enzimas caspasas reconocen específicamente una secuencia de 4 o 5 aminoácidos en el sustrato objetivo, que necesariamente incluye un residuo de ácido aspártico. Este residuo es la diana de la ruptura, que se produce en el extremo carbonilo del residuo de ácido aspártico. Elegimos la determinación de la actividad de la enzima Caspasa-3 (CSP-3) como marcador apoptótico.

Para ello, utilizamos el kit fluorimétrico de Caspasa-3 (Sigma-Aldrich, Ref. CASP3C) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo se basa en la hidrólisis del sustrato peptídico Ac-DEVD-AMC (acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina) por CSP-3, que libera la fracción fluorescente AMC (7-amino-4-metilcumarina) analizada mediante espectrofotometría (Ex/Em = 360/460 nm). Las neuronas en co-cultivo se lisaron directamente sobre la placa con un tampón de lisis (50 mM HEPES, 5 mM CHAPS, 5 mM DTT, pH 7.4) durante 20 minutos en hielo. Posteriormente, el ensayo se realizó en placas de 96 pocillos ($V_f=200 \mu\text{l}$), los lisados se incubaron en el tampón (20 mM HEPES, 2 mM EDTA, 0,1% CHAPS, 5 mM DTT, 16 μM Ac-DEVD-AMC, pH 7,4) suplementado con el sustrato Ac-DEVD-AM. La determinación se llevó a cabo en un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Fisher) durante 2 horas, a intervalos de 20 minutos a 37 °C. La actividad de CSP-3 se evaluó de acuerdo con la cinética de liberación de AMC, extrapolando los valores de las pendientes obtenidas en una curva estándar de AMC. Los valores de actividad de CSP-3 se expresan en unidades arbitrarias según el número de veces (*fold*) con respecto a la condición control, a la que asignamos el valor de referencia 1.

12. Determinación de la masa mitocondrial.

El ADN mitocondrial (ADN_{mt}) representa un blanco crítico para el daño oxidativo. Dada la alta generación de ROS en este orgánulo, el ADN_{mt} está ampliamente expuesto y una vez dañado amplificar el estrés oxidativo al disminuir la expresión de proteínas críticas importantes para el transporte de electrones, lo que conduce a un círculo vicioso de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disfunción mitocondrial que finalmente puede desencadenar señales de apoptosis (Van Houten et al. 2006; Woo et al. 2012). Además, el número de copias de ADN_{mt} y la densidad varían radicalmente entre diferentes tipos

de células, esto junto a la heteroplasmia (definida como la fracción de cada variante alélica de ADN_{mt} por célula) son una fuente potencial de heterogeneidad genotípica mitocondrial, varios estudios sugieren que la densidad de ADN_{mt} es un proceso altamente controlado y específico dentro de cada tipo celular (Aryaman, Johnston, and Jones 2019). Por eso, la determinación del número de copias es un parámetro ampliamente utilizado para evaluar patologías mitocondriales y se suele asociar con la masa mitocondrial. En este trabajo utilizamos dos métodos para estudiar la proporción mitocondrial en cultivos primarios de astrocitos como control de masa mitocondrial, esta aproximación no tiene en cuenta las variantes alélicas ni el grado de heteroplasmia.

12.1. Copias de ADN mitocondrial (ADN_{mt}).

La cantidad de copias de ADN_{mt} se realizó mediante qPCR midiendo la abundancia relativa de genes mitocondriales: *mt-Co2* (citocromo oxidasa subunidad 2 mitocondrial) y *Sdh* (succinato deshidrogenasa), codificados por ADN mitocondrial y nuclear (ADN_n), respectivamente. El ADN total se extrajo y purificó de cultivos de astrocitos mediante kits comerciales basados en columnas de sílice. Las muestras a comparar deben procesarse de forma paralela y evaluarse su calidad espectrofotométricamente mediante Nanodrop ((260/280>1.9, y 260/230>1.8), ya que la pureza y degradación del ADN tiene un efecto directo en la eficiencia de la reacción.

Posteriormente, la amplificación de fragmentos de ambos genes se realizó mediante qPCR con el kit Power SYBR Green PCR Master Mix siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se realizaron por triplicado empleando el termociclador Mastercycler ep Realplex (Eppendorf). Partimos de 7,5 ng de ADN total en un volumen final de 20 µl en placas de 96 pocillos. Los oligonucleóticos cebadores (250 nM, concentración final) para amplificar cada gen son: *mt-Co2-For* 3'- CTACAAGACGCCACAT-5', *mt-Co2-Rev* 3'- GAGGGGGAGAGCAAT-5', *Sdh-For* 3'- TACTACAGCCCCAAGTCT-5' y *Sdh-Rev* 3'- TGGACCCATCTTCTATGC-5'. Las condiciones del programa para la amplificación fueron: 2 min- 95 °C, (15 seg-95 °C, 60 seg- 60 °C) x 40 ciclos, y finalmente una curva de disociación.

Tras la amplificación, se obtuvieron los valores de Ct para cada réplica, que representan el ciclo en el cual se supera el umbral de amplificación. El número de copias de ADN_{mt} (*mt-co2*) relativo al número de copias de un gen mitocondrial de codificación nuclear (*Sdh*) (2 copias) se calculó según la fórmula $2^{*(2^{\Delta Ct})}$ dónde, $\Delta Ct = Ct_n - Ct_{mt}$, es decir, $\Delta Ct = Ct_{Sdh} - Ct_{mt-Co2}$.

12.2. Masa mitocondrial.

Otra aproximación para estimar la masa mitocondrial se realizó mediante citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences). Para ello, utilizamos un kit comercial de marcaje mitocondrial CytoPainter (Abcam, Ref. ab112143), basado en un compuesto hidrófobo que penetra en las células vivas intactas y se dirige específicamente a la mitocondria dónde se incorpora a favor de potencial de membrana mitocondrial, para marcar las mitocondrias de células vivas con fluorescencia verde (Ex/Em = 490/520 nm). La intensidad mitocondrial se normalizó frente a la intensidad total derivada del marcaje nuclear del ADN total con la sonda 7-AAD (*apartado 10*).

Los cultivos de astrocitos primarios se incubaron con una concentración (1:1000) de la sonda comercial CytoPainter-Green (Abcam, Ref. ab112143) en las condiciones habituales de cultivo celular (temperatura a 37 °C y una atmósfera del 5% de CO₂) en tampón Hank's Balanced Salt Solution (HBSS: NaCl 134,2 mM; KCl 5,26 mM; KH₂PO₄ 0,43 mM; NaHCO₃ 4,09 mM; Na₂HPO₄·2H₂O 0,33 mM; glucosa 5,44

mM; HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico) 20 mM; CaCl₂·2H₂O 4 mM; pH 7,4). Posteriormente, se lavó el exceso de sonda y los astrocitos se tripsinizaron, se fijaron y permeabilizaron con la solución BD Cytofix/Cytoperm durante 15 minutos y se lavaron con la solución 1X BD Perm/Wash. Posteriormente, se añadieron 10 µl 7-AAD (BD Biosciences, ref 552598) por cada 10⁶ células para el marcaje de ADN total de células permeabilizadas. El seguimiento de los niveles de fluorescencia se evaluó mediante citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences) en los canales, FL-1 para la fluorescencia verde del marcaje mitocondrial y FL-3 para el marcaje de 7-AAD. Los datos se representan como el ratio de las medias de la intensidad de fluorescencia detectada en los canales FL-1/FL-3, para representar la señal mitocondrial con respecto a la nuclear.

13. Determinación del flujo glucolítico.



Figura X. Sistema para captación de radiactividad.

El flujo glucolítico se determinó mediante la producción de agua tritiada (³H₂O) a partir de glucosa marcada radiactivamente con tritio ([3-³H]-glucosa). De esta manera se evalúa el consumo de glucosa por vía glucolítica, mediante la cuantificación de ³H₂O, originada en la reacción catalizada por la triosa fosfato isomerasa en la ruta glucolítica. Para ello, los astrocitos se re-sembraron (DIV8) sobre el fondo de frascos de cultivo de 25 cm² (**Figura X**), por triplicado hasta DIV15. 24 horas previas al experimento se renovó el medio de cultivo y para la determinación del flujo glucolítico el medio se sustituyó por 2,5 ml de medio KRPG/frasco (Krebs Ringer Phosphate Glucose Buffer: NaCl 145 mM; Na₂HPO₄ 5,7 mM; KCl 4,86 mM; CaCl₂ 0,54 mM; MgSO₄ 1,22 mM; glucosa 5,5 mM; pH 7,35) suplementado con 5 µCi/ml de [3-³H]-glucosa (Perkin Elmer). Para la determinación del ³H₂O formado, se fijó mediante un alambre a la boca del frasco de 25 cm² un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 1 ml de agua (para la captura de ³H₂O) y la atmósfera interior se gaseó con una mezcla de O₂: CO₂ (95/5) durante 20 segundos antes de cerrarlo. Los frascos se incubaron a 37 °C en un agitador orbital termostatzado (Forma, modelo 420, Thermo Fischer). La puesta a punto en nuestro laboratorio (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P. Bolaños 2009) determinó que la retención de la recolección de ³H₂O en el tubo con H₂O es lineal con un tiempo de hasta 120 minutos; por lo tanto, todas las incubaciones se realizaron durante 2 horas. Las reacciones se detuvieron añadiendo 0,2 ml de 20 %, v/v, de ácido perclórico (HClO₄) mediante una jeringuilla a través del tapón de goma, y los frascos se incubaron a 37 °C durante 72 horas para permitir el equilibrio de ³H₂O entre el agua y el medio de incubación. Pasadas las 72 horas se recolectaron los tubos Eppendorf para cada condición sobre 10 ml de líquido de centello en viales independientes, la cantidad de radiactividad se determinó utilizando un contador de centelleo Tri-Carb 4810 TR (PerkinElmer). La puesta a punto de este método también determinó que, los niveles de ³H₂O equilibrada entre el medio aplicado sobre las células y el tubo Eppendorf era del 28% (reflejando así un 70 % real de eficiencia de recuperación). Se utilizaron blancos sin células en paralelo, cuyos valores se restaron a los de todas las medidas. Para los cálculos se utilizó la radiactividad específica de la glucosa utilizada (dpm/mol), teniendo en cuenta el valor de eficiencia (28 % para ³H₂O), y los resultados se expresaron como nmol de glucosa D-[3-³H] incorporado en ³H₂O por hora y por mg de proteína (flujo glucolítico).

14. Evaluación *ex vivo* del flujo glucolítico en cerebro de ratón.

Este experimento se realizó en colaboración con el laboratorio de Sebastián Cerdán (Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid). Los ratones Control y GFAP-mCAT (20 meses de

edad) fueron inyectados con un único bolo intraperitoneal de [1-¹³C]-glucosa y después de 15 minutos se sacrificaron utilizando una irradiación de microondas focalizadas. Este método de sacrificio es crítico para garantizar un bloqueo del metabolismo rápido, evitando la generación de nuevos metabolitos durante los procesos *post mortem* y estudiar únicamente las concentraciones de metabolitos generados *in vivo*. Posteriormente, la cuantificación de metabolitos se realizó *ex vivo* en extractos cerebrales mediante resonancia magnética nuclear de carbono (¹³C-RMN). De este análisis, se destacamos los niveles de [3-¹³C]-lactato, derivados del consumo *in vivo* de [1-¹³C]-glucosa, y normalizados por el estándar interno 1,4-dioxano, como reflejo del flujo glucolítico cerebral *in vivo*.

15. Determinación del flujo de la vía de las pentosas fosfato.

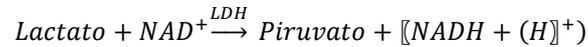
El método de determinación del flujo de la vía de las pentosas fosfato (PPP) también fue previamente puesto a punto en nuestro laboratorio (Rodríguez-Rodríguez et al. 2013), tiene en cuenta la diferencia del consumo de glucosa metabolizada en el ciclo de Krebs y la PPP. Para ello, los astrocitos se re-sembraron (DIV8) sobre el fondo de frascos de cultivo de 25 cm² por triplicado hasta DIV15. 24 horas previas al experimento se renovó el medio de cultivo y para la determinación del flujo de PPP el medio se sustituyó por 2,5 ml de medio KRPG/frasco (Krebs Ringer Phosphate Glucose Buffer: NaCl 145 mM; Na₂HPO₄ 5,7 mM; KCl 4,86 mM; CaCl₂ 0,54 mM; MgSO₄ 1,22 mM; glucosa 5,5 mM; pH 7,35) suplementado con 0,5 µCi /ml de [1-¹⁴C]-glucosa o [6-¹⁴C]-glucosa (Perkin Elmer). Para la determinación, mediante un montaje idéntico al descrito para el flujo glucolítico, se fijó mediante un alambre a la boca del frasco un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 0,8 ml de hidróxido de bencetonio (Sigma-Aldrich) para capturar el ¹⁴CO₂ formado, y la atmósfera interior se gaseó con una mezcla de O₂: CO₂ (95/5) durante 20 segundos antes de cerrarlo. Los frascos se incubaron a 37 °C en un agitador orbital termostatzado (Forma, modelo 420, Thermo Fischer) durante 90 minutos. Las reacciones se detuvieron añadiendo 0,2 ml de 20 %, v/v, de ácido perclórico (HClO₄) mediante una jeringuilla a través del tapón de goma, y los frascos se incubaron otros 90 minutos para capturar el ¹⁴CO₂ formado en el medio de incubación en el tubo Eppendorf. Una vez finalizado el segundo paso de 90 minutos, se recolectaron los tubos Eppendorf para cada condición sobre 10 ml de líquido de centello en viales independientes, la cantidad de radiactividad se determinó utilizando un contador de centelleo (Tri-Carb 4810 TR, PerkinElmer).

El ¹⁴CO₂ originado a partir del metabolismo de [1-¹⁴C]-glucosa deriva de la descarboxilación mediante la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) en la PPP y de la descarboxilación del acetil-CoA mediante las enzimas isocitrato deshidrogenasas y α-cetoglutarato deshidrogenasa en el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarbónicos (TCA). A su vez, el ¹⁴CO₂ generado a partir del metabolismo de [6-¹⁴C]-glucosa procede únicamente de la actividad del TCA. Por tanto, la determinación del flujo de PPP se realizó calculando la diferencia del ¹⁴CO₂ originado a partir de [1-¹⁴C]-glucosa, derivado del ciclo de Krebs y PPP, y el generado a partir del metabolismo de [6-¹⁴C]-glucosa exclusivamente en el ciclo de Krebs. Se utilizaron blancos sin células en paralelo, cuyos valores se restaron a los de todas las medidas. Para los cálculos se utilizó la radiactividad específica de la glucosa utilizada (dpm/mol), y los resultados se expresaron nmol de glucosa transformados en CO₂/hora/mg de proteína (flujo PPP).

16. Determinación enzimática de lactato extracelular.

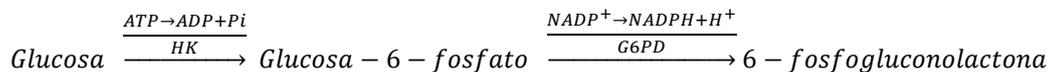
Las concentraciones de lactato se midieron espectrofotométricamente en el medio de cultivo determinando los incrementos en la absorbancia de las muestras a 340 nm para determinar la aparición

de NADH, según el método de Gutmann y Wahlefeld (1974) durante 1 hora (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P. Bolaños 2009). Para la reacción se utilizaron 10 µl de medio de cultivo sobre 90 µl de mezcla de reacción (tampón 0,25 M de glicina; 0,5 M de hidracina; 1 mM de EDTA a pH 9,5 suplementado con 1 mM NAD⁺ y 22,5 U/ml de la enzima lactato deshidrogenasa (Roche).



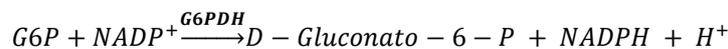
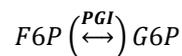
17. Determinación enzimática de glucosa extracelular.

Las concentraciones de glucosa se midieron espectrofotométricamente en el medio de cultivo determinando los incrementos en la absorbancia de las muestras a 340 nm para determinar la aparición de NADPH, según el método de Bergmeyer (1974) cada 10 minutos durante 1 hora (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P. Bolaños 2009). Para la reacción se utilizaron 10 µl de medio de cultivo sobre 90 µl de mezcla de reacción (tampón Tris-HCl 38,5 mM pH 8; MgCl₂ 3,8 mM suplementado con ATP 0,38 mM, NADP⁺ 0,38 mM y las enzimas (Roche) glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) 1 U/ml, hexoquinasa (HK) 2 U/ml).



18. Determinación enzimática de fructosa extracelular.

Para la determinación de fructosa mediante un método enzimático, se determinaron simultáneamente en las mismas muestras las concentraciones de glucosa y fructosa gracias al acoplamiento de las siguientes reacciones enzimáticas catalizadas por las enzimas hexoquinasa (HK), fosfogluconasa isomerasa (PGI) y glucosa-6-fosfo deshidrogenasa (G6PDH), midiendo los incrementos de absorbancia a 340 nm, procedentes de la formación de NADPH con una estequiometría 1:1 con la fructosa y/o la glucosa.

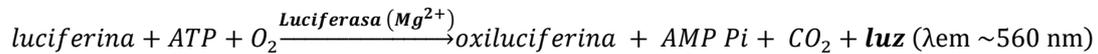


La concentración de D-fructosa de la muestra se determina tras la determinación del contenido de determinación de D-glucosa, después de la isomerización por la PGI.

Además, la fructosa se determinó mediante espectrometría de masas con el Servicio Análisis Elemental Cromatografía y Masas de la Universidad de Salamanca en muestras de cerebro de ratones de 1 mes de edad. Se realizó una extracción de 3 fases metanol-agua-cloroformo (Sapcariu et al. 2014) para extraer los metabolitos de interés en la fase polar. Se evaporó el exceso de solvente para concentrar los metabolitos deseados. Posteriormente, la determinación de fructosa se realizó en paralelo de un estándar puro de fructosa mediante derivatización de las muestras por espectrometría de masas utilizando patrones internos para la cuantificación.

19. Determinación de los niveles de ATP intracelular.

La detección de la concentración de los niveles de ATP total en cultivos de astrocitos se llevó a cabo con un kit comercial de bioluminiscencia basado en luciferasa y su sustrato D-luciferina (Invitrogen™ Molecular Probes™, Thermo Fisher Scientific, Ref. A22066). El ensayo se basa en el requerimiento de consumo de ATP de la luciferasa recombinante para la producción de luz (max. $\lambda_{em} \sim 560$ nm a pH 7,8) según la reacción:



Para ello, los cultivos de astrocitos se lavaron con PBS y, en frío, se lisaron directamente con ácido perclórico (HClO₄) 0,3 M que se neutralizó hasta pH $\sim 7,0$ añadiendo bicarbonato potásico (HKCO₃ 0,5 M aprox. 250 μ l en 500 μ l de HClO₄ por cada $\sim 5 \cdot 10^5$ células). Tras 15 minutos en hielo, las muestras se centrifugaron para decantar el precipitado formado y se utilizaron 10 μ l de muestra para la determinación, siguiendo las instrucciones del fabricante en un volumen final de 100 μ l. La reacción se llevó a cabo a 28 °C sobre placas opacas y la luminiscencia se siguió en un lector de placas tipo Varioskan Flash (Thermo Fisher), cada 5 minutos durante 20 minutos. Los valores se expresan en nmol ATP/mg proteína de acuerdo con los valores de una recta patrón de estándares de ATP y la normalización de la proteína total del extracto analizado.

20. Determinación del consumo de oxígeno celular.

Para la determinación del consumo de oxígeno extracelular en cultivos de astrocitos primarios, utilizamos un ensayo basado en la sonda comercial MitoXpress® Xtra (Luxcel Biosciences). Este ensayo se realizó en astrocitos re-sembrados en placas de 96 pocillos. En este ensayo, la colisión molecular del oxígeno (O₂) del medio con la sonda fluorescente MitoXpress® Xtra, produce un fenómeno de *quenching* de fluorescencia que provoca una disminución de la intensidad de su fluorescencia por modificaciones del estado de excitación y transferencia de energía (Will et al. 2007). Por lo tanto, la cantidad de la señal de fluorescencia es inversamente proporcional a la cantidad de O₂ extracelular en la muestra. Para calcular la tasa de consumo de oxígeno se calcularon las variaciones de la señal de fluorescencia a lo largo del tiempo en una atmósfera sellada mediante una gota de aceite mineral inerte. La reacción se llevó a cabo a 37 °C sobre placas de 96 pocillos, por octuplicado por condición, y la fluorescencia se siguió en un lector de placas tipo Varioskan Flash (Thermo Fisher), cada minuto durante 120 minutos. Para la puesta a punto del método se utilizó un ensayo con glucosa oxidasa para evaluar el consumo de oxígeno en el medio sin células, en las mismas condiciones que se probarían para el ensayo del consumo de oxígeno de astrocitos. También se estudió como control del ensayo en pocillos paralelos con astrocitos, el consumo de oxígeno tras el tratamiento con Antimicina A (inhibidor del complejo III) y CCCP (agente desacoplante mitocondrial) para evaluar un descenso y un incremento del consumo de oxígeno, respectivamente. Los valores se expresan como una cinética en RFU/hora, unidades arbitrarias de fluorescencia (RFU, del inglés, *relative fluorescence units*), considerando las pendientes durante 1 hora de incremento lineal de fluorescencia durante el ensayo, descartando el comienzo de éste por la necesidad de estabilización.

21. Análisis transcriptómico de astrocitos y neuronas aisladas de cerebro de ratón adulto mediante microarrays de expresión.

El análisis del transcriptoma completo se realizó en muestras de neuronas y astrocitos obtenidos de ratones de 14 meses de edad, Control (+/+; *mCat^{LoxP}/+*) o GFAP-mCAT (*GFAP-Cre^{ERT2}/+*; *mCat^{LoxP}/+*) (n=4 animales por genotipo). Para la obtención de muestras se realizó la disgregación del tejido y posterior aislamiento celular según el método inmuno-magnético (*apartado 4.2*). Los mismos animales fueron utilizados para el aislamiento de ambos tipos celulares, para ello, la disgregación del tejido cerebral fue común hasta el inicio de los protocolos específicos para la separación de astrocitos y neuronas de ratón adulto. Posteriormente, se extrajo y purificó el ARN total de todas las muestras utilizando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad y cantidad de ARN de todas las muestras se evaluaron con un Bioanalizador Agilent 2100 (**Figura V**) en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca).

Una vez garantizada la calidad del ARN obtenido mediante este aislamiento, se llevó a cabo el análisis de expresión del genoma completo utilizando microarrays Clariom™ D Array para ratón (*Mouse Transcriptome Array 1.0, MTA-1_0*, Affymetrix, Thermo Fisher Scientific). El proceso de marcaje de las muestras, hibridación, lavados y tinciones y escaneado fue realizado de manera independiente por la Unidad de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca) de acuerdo con sus protocolos y estándares de calidad para este tipo de metodología.

Posteriormente, el análisis de datos forma parte de este trabajo de tesis doctoral, aunque tan sólo se muestran un filtrado de resultados y no todas las aproximaciones realizadas para obtener información de este estudio. Para ello, se utilizó el software Transcriptome Analysis Console (TAC 4.0) (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific). Se compararon las diferencias relativas dentro del mismo tipo celular según las condiciones Control y GFAP-mCAT. Por tanto, se realizaron análisis independientes para las muestras de astrocitos y de neuronas, aunque el procedimiento fue similar de acuerdo con lo descrito a continuación. La normalización de los datos de microarrays es un paso fundamental antes de comparar sus valores y debe realizarse únicamente con las muestras a comparar ya que la normalización debe tener en cuenta la variabilidad intra- e inter-microarrays. La normalización de los datos con TAC se realizó, a nivel de gen y de exones, mediante el algoritmo SST-RMA (del inglés, *Signal Space Transformation-Robust Multi-Chip Analysis*) que estima y elimina la intensidad de ruido de fondo y normaliza los resultados intra- e inter-microarrays, según la intensidad detectada para sondas internas.

Tras la normalización, la expresión diferencial para cada transcrito analizado se calculó utilizando el valor medio en escala logarítmica de base 2 de cada conjunto de sondas. Para evaluar la expresión diferencial establecimos el filtro estadístico de p-valor < 0,05 (según la prueba estadística Limma, análisis de eBayes, seleccionada por defecto en el software TAC para este tipo de análisis) y aquellos cambios $\pm 1,3$ en número de veces (*fold*). Una de las características intrínsecas al estudio con microarrays son los problemas de dimensionalidad ya que cada muestra depende de tantas variables como sondas (transcritos) formen el microarray, y viceversa. Existen técnicas de estadística descriptiva, que tratan de reducir esa dimensionalidad y que permiten encontrar grupos de muestras (o de sondas) con un comportamiento similar. Entre estas técnicas, el agrupamiento (*clustering*) jerárquico en microarrays es una de las más conocidas (popularizado por Eisen (1998) (Eisen et al. 1998) y revisado (Krushevskaya et al. 2009)). El *clustering* consiste en la agrupación de elementos según la distancia entre ellos que se

representa mediante dendrogramas (árboles de similitud). Se utilizó un algoritmo de *clustering* supervisado en base a los filtros establecidos, que de forma iterativa trata minimizar la distancia media entre elementos de un grupo, para originar un dendrograma. En base a ese dendrograma se genera un mapa de calor (*Heatmap*) con los niveles de expresión de cada sonda/transcrito que proporciona una imagen más intuitiva de la función de *clustering*. En nuestro caso, TAC también se utilizó para generar los gráficos tipo *volcano plot* y dendrogramas con mapas de calor, en base a sus algoritmos de agrupamiento.

Las listas de transcritos filtrados se analizaron funcionalmente mediante la herramienta informática online Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID versión 6.8) (Huang, Brad T Sherman, and Lempicki 2009; Huang, Brad T. Sherman, and Lempicki 2009) y Integrated Molecular Pathway Level Analysis (IMPALA versión 11). El algoritmo de esta herramienta realiza, a partir de la lista de transcritos proporcionada, una búsqueda simultánea en distintas bases de carácter biológico; análisis ontológico, interacciones, rutas moleculares involucradas, eliminación de redundancias y enriquecimiento funcional de grupos de transcritos relacionados. En función de este análisis cada transcrito es "anotado" según los términos de estas bases de datos de ontología genética (que los anota para: la función molecular, su rol en procesos biológicos y su localización celular), dominios proteicos o patologías relacionadas, entre otros. En base a estas anotaciones se establecen grupos enriquecidos (*clusters*) de transcritos con características comunes según su anotación funcional. Por último, estos *clusters* se revisaron manualmente para seleccionar aquellos con mayor relevancia en nuestro estudio, que denotamos según las anotaciones funcionales de los transcritos que incluyen (por ejemplo, "metabolismo", "enlace de disulfuro").

22. Análisis metabolómico en muestras de cerebro de ratón adulto.

El análisis de metabolómica se realizó a partir de un hemisferio cerebral obtenido de ratones de 14 meses de edad, Control (+/+; *mCat^{LoxP}/+*) o GFAP-mCAT (*GFAP-Cre^{ERT2}/+*; *mCat^{LoxP}/+*) (n=7 animales por genotipo). Para ello, una vez sacrificados los animales el cerebro se dividió por la línea media que separa ambos hemisferios y éstos se congelaron de manera independiente mediante inmersión en nitrógeno líquido. Posteriormente, se almacenaron a -80 °C y las muestras se enviaron en estas condiciones a la empresa especializada Metabolon (Morrisville, NC, EUA) para realizar un estudio metabolómico no dirigido con el objetivo de obtener el mayor espectro metabólico de estas muestras cerebrales. Este análisis nos permitió elaborar un perfil bioquímico del contenido metabólico cerebral y comparar, mediante un análisis estadístico, este perfil en nuestras condiciones de estudio tras la modificación de los niveles de ROS en astrocitos.

El análisis realizado por Metabolon consistió en el acoplamiento en tándem de cromatografía líquida de alta resolución a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS), mediante el cual se consiguieron detectar 540 metabolitos diferentes. El servicio de Metabolon extrajo, identificó los datos primarios y realizó un procesamiento que consistió en el curado de los datos, normalización para su comparación relativa y control de calidad. A este proceso, le siguió la transformación de los registros y la eliminación de los valores perdidos, con el valor mínimo observado para cada compuesto, se utilizó la prueba t de Welch de dos muestras para identificar compuestos significativamente diferentes entre los dos grupos experimentales. Según los valores obtenidos en esta prueba estadística, establecimos un q-valor $\leq 0,50$ con el que aceptamos una estimación alta de la tasa de falsos descubrimientos. No obstante, se implementaron otras consideraciones para determinar si un resultado merecía un mayor escrutinio.

Entre estas consideraciones se incluyó (i) la significatividad estadística de acuerdo al p-valor, (ii) inclusión en una vía común con un compuesto altamente significativo, (iii) residencia en una familia bioquímica funcional similar con otros compuestos significativos o (iv) correlación con otros enfoques experimentales que demuestren importancia para otra dimensión del estudio. Se utilizó el software Cytoscape 3.6.0 para la visualización y análisis de las redes de rutas biológicas. Los gráficos correspondientes al análisis estadístico se realizaron con la herramienta online MetaboAnalyst 4.0.

23. Perfusión de los animales y análisis inmunohistoquímico.

Para el análisis inmunohistoquímico, en primer lugar, los ratones machos (de 14 meses de edad) fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de una mezcla de clorhidrato de xilacina (Rompun; Bayer) y clorhidrato de ketamina/clorbutol (Imalgene; Merial) (1:4) a 1 ml/kg de peso corporal y luego perfundidos intra-aórticamente con 0,9% NaCl seguido de 5 ml/g de peso corporal de solución de fijación Somogyi (Paraformaldehído, 4% (p/v) y ácido pícrico, 0,2% (v/v), en 0,1M PBS a pH 7,4. Tras la perfusión, los cerebros se seccionados sagitalmente a partir de la línea media que separa ambos hemisferios y se continuaron post-fijando inmersos en la misma solución durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, los hemisferios cerebrales se lavaron durante 10 min, 30 min y 2 horas con solución de PBS de 0,1M. Posteriormente, para la crioprotección los hemisferios se sumergieron secuencialmente en soluciones de sacarosa en PBS (0,1M) al 10%, 20% y 30% (p/v) a 4 °C hasta que la muestra se hunde en la solución (aproximadamente 30 min, 2 horas y 12-24 horas, respectivamente). Por último, los hemisferios se embebieron en solución OCT® (Tissue-Tek®, Sakura), un medio para la incrustación de secciones congeladas, dejando cubrir y sobrepasar unos 2 mm la muestra. Para ello, se añadió OCT en moldes previamente identificados con precaución de no formar burbujas, ya que dificultan la obtención de cortes adecuados. El medio de inclusión ayuda a eliminar el calor de la muestra durante el proceso de congelación, preserva adecuadamente el tejido previniendo la desecación durante el almacenamiento y sustenta el tejido en el proceso del corte. Finalmente, el criomolde con el OCT y la muestra se colocó sobre una superficie metálica enfriada con nitrógeno líquido de forma que la superficie de OCT quede horizontal, la congelación de esta forma es progresiva evitando grietas en la resina que dificultan el corte posterior. Las muestras se mantuvieron congeladas a -80 °C.

Para este trabajo, las muestras de cerebro se procesaron para obtener secciones sagitales de 40 µm de grosor con un criostato (Leica CM1950) a una temperatura de trabajo de ~-20-24 °C. Se tomaron precauciones para asegurar que los ángulos de sección entre las diferentes condiciones se mantuvieran equivalentes. Las secciones se recogieron de forma seriada, ordenándolas una placa de 12 pocillos en PBS (0,1 M). Posteriormente, antes de su uso para inmunohistoquímica/tinción Nissl se enjuagaron 3 veces durante 10 minutos en PBS. Los pocillos con las secciones que no se utilizaron se mantuvieron en mezcla del congelación (polietilenglicol 30% y glicerol 30% en 0,1 M PBS) a -20°C. Para inmunohistoquímica, las secciones se incubaron secuencialmente en (i) 5 mg/ml de borohidruro sódico en PBS durante 30 min (para eliminar la autofluorescencia de aldehídos); (ii) tres lavados de PBS de 10 min cada uno; (iii) en PBS (0,1 M) con 0,02% Triton X-100 y 5% suero fetal de cabra (Jackson Immuno-Research) para la incubación con los anticuerpos primarios durante 72 horas a 4 °C (ver apartado *anticuerpos*); (iv) tres lavados de PBS de 10 minutos cada uno; (v) en PBS 0,1 M durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoroforos (ver apartado *anticuerpos*); y (vi) 0,5 µg/ml DAPI en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras un último

lavado con PBS, las secciones se montaron con un medio de montaje acuoso Fluoromount™ (Sigma-Aldrich) para prolongar la fluorescencia de los cortes, sobre portaobjetos previamente gelatinizados (MenzelTM, Thermo)(Bobo-Jiménez et al. 2017) a los que se colocó un cubreobjetos.

Tinción Nissl. Los portaobjetos, preparados según lo previamente descrito, se sumergieron en una mezcla 1:1 de etanol absoluto y cloroformo durante 12 horas para eliminar la grasa y así conseguir menor tinción de fondo. Las secciones se hidrataron mediante la inmersión secuencial en alcohol de concentración decreciente hasta una última inmersión en agua destilada (H₂O_d) (xileno (x2) - etanol absoluto (x2) - 96% - 90% - 80% - 70% - 60% -50% - H₂O_d). A continuación, las secciones se tiñeron con una solución de Cresil Violeta (acetato para-cresilo) al 0,1% (p/v) y ácido acético glacial al 0,3% (v/v) en H₂O_d H₂O_d, durante 5-10 min. Finalmente, los portaobjetos se sumergieron secuencialmente por una batería de alcoholes de graduación creciente para deshidratarlos. Tras la inmersión en alcohol 96% cuando se alcanzó la tinción deseada, se deshidrataron durante 10 minutos en alcohol absoluto y se lavaron con xileno (2 x 10 min). Por último, las preparaciones se montaron con solución Entellan y cubreobjetos.

Adquisición de imágenes de microscopía y cuantificación. Tras la inmunohistoquímica de las secciones cerebrales, las muestras se examinaron con epifluorescencia para su cuantificación y mediante microscopía confocal para las imágenes seleccionadas. Las imágenes de fluorescencia de secciones completas de cerebro corresponden a la reconstrucción de imágenes de epifluorescencia adquiridas con un objetivo 20X mediante el software del microscopio Operetta CLS high-content (PerkinElmer). La epifluorescencia se realizó utilizando un microscopio invertido (Nikon; Eclipse® Ti-E) equipado con un iluminador de fibra pre-centrado (Nikon; Intensilight C-HGFI), una cámara digital CCD en blanco y negro (Hamamatsu; ORCA-E.R.) y un objetivo Plan 40x/0.65 ∞/0.17 WD 0.56. Las imágenes confocales se obtuvieron utilizando un microscopio espectral de láser confocal (TCS-SL; Leica Microsystems). Se obtuvieron grandes campos de visión con un HCX 40x/0.75 PH2 Plan Fluotar con un tamaño de píxel de ~300 nm a una velocidad de escaneo de 400 Hz. Las imágenes de alta resolución se obtuvieron utilizando un objetivo de aceite HCX 63x/1.4 - 0.60 Plan Apo CS con un tamaño de píxel de 100 nm y un tamaño de paso z de 290 nm a una velocidad de exploración de 400 Hz.

Para la cuantificación, se utilizaron las imágenes digitales adquiridas mediante epifluorescencia, la tinción inmunohistoquímica de las diferentes proteínas examinadas se evaluó en las tres secciones más sagitales de los cortes seriados (n = 3 ratones por condición). Las imágenes se exportaron en formato *.tiff* para su procesamiento mediante el software FIJI (ImageJ). Para la cuantificación, las imágenes se convirtieron a imágenes de 8 bits, en escala de grises y el brillo/contraste se ajustó de forma automática para todas las imágenes adquiridas en idénticas condiciones. Posteriormente, se definió un umbral de intensidad y se cuantificaron los negativos de las imágenes “umbral” según el área porcentual (fracción de área), que representa el porcentaje de píxeles en la imagen que han sido resaltados por superar el umbral definido (área %). Las imágenes mostradas corresponden a una proyección de máxima a partir de las series en z (grosor de la muestra) de 15 a 19 μm.

24. Anticuerpos.

Western blot: anti-GFAP (1/1000) (G9269, Sigma), anti-catalasa (1/1000) (PA5-23246, Thermo Scientific), anti-GAPDH (1/40000) (4300, Ambion), anti-HA tag (1/10000) (26183, Thermo Scientific), anti-

HA-tag (1/1000) (C29F4, Cell Signaling), anti-VDAC (1/1000) (PC548, Calbiochem), anti-PSD95 (6G6-1C9; Affinity BioReagents), anti-active caspase-3 (1/1000) (Asp175; Cell Signaling Technology), Anti-SYP (1/1000) (YE269, Abcam), anti- NDUFS1 (1/500) (sc-50132, Santa Cruz), anti-SDHA (1/1000) (ab14715, Abcam), anti-UQCRC2 (1/500) (ab14745, Abcam), anti-mt-CO1 (1/1000) (ab14705, Abcam) anti- β -ATP (1:1,000) (MS503,984 MitoSciences), y anti- β -ACTIN (1/30000) (A5441, Sigma).

Imunohistoquímica e inmunocitoquímica.

Primarios: anti-HSP60 (1/500) (ab46798, Abcam), anti-HA tag (1/1000) (2367, Cell Signaling), anti-HA-tag (1/1000) (C29F4, Cell Signaling), anti-mt-CO1 (1/1000) (ab14705, Abcam), anti-MAP2 (1/500) (AP-20; Abcam #11268), anti-beta III Tubulina (Tuj1) (1/500) (Abcam #18207), anti-GFAP (1/500) (G6171; Sigma-Aldrich), anti-IBA1 (1/500) (019–19741; Wako).

Secundarios: Cy2 goat anti-mouse (1/500) (115-225-003), Cy2 goat anti-rabbit (1/500) (111-225-144), Cy3 goat anti-mouse (1/500) (115-165-003) y Cy3 goat anti-rabbit (1/500) (111-165-003) (Jackson ImmunoResearch).

25. Análisis del comportamiento espontáneo del ratón.

Las pruebas de comportamiento se realizaron con ratones machos (8-10 meses de edad), tras un período de aclimatación de al menos 15 minutos en las salas habilitadas para cada ensayo que se realizó en la misma franja horaria durante su ciclo de luz (2 pm-8 pm). Para la realización de las pruebas también se tuvo en cuenta el descanso de los ratones, y la precaución de evaluar diferentes pruebas en diferentes semanas para una mejor interpretación de las respuestas observadas. Para todas las pruebas realizadas, antes del inicio de la prueba para cada animal se limpió cuidadosamente el aparato correspondiente con etanol al 70% y agua entre ensayos para eliminar cualquier indicio de olor y/o estímulo olfativo.

25.1. Coordinación motora evaluada en Rotarod.

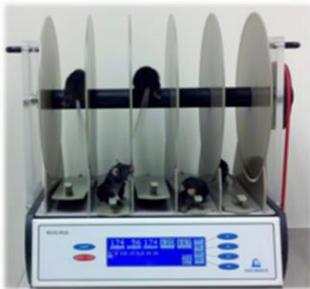


Figura XI. Rotarod.

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, **Figura XI**) que subdivide el cilindro rodante en 5 carriles para la evaluación simultánea de hasta 5 ratones. Para esta prueba utilizamos una rampa de velocidad desde 4 a 25 revoluciones por minuto (rpm), con una aceleración constante (4,5 rpm) durante 300 segundos, alcanzándose la velocidad máxima de esta manera a los 270 segundos. Antes de someter a los ratones a esta prueba, se requiere un entrenamiento previo. Este entrenamiento se realizó durante 3 días consecutivos, el primer día (día -4) se expuso a los ratones al nuevo ejercicio con una velocidad constante de 4 rpm, durante 3 intentos separados por un periodo de descanso mínimo de 15 min. Los 2 días posteriores (días -3 y -2), se probaron las condiciones experimentales del ensayo como parte del entrenamiento. Tras dos días de descanso, los animales se sometieron a esta prueba en la rampa acelerada de 4 a 25 rpm durante 3 días consecutivos (días 1,2 y 3). El resultado de esta prueba es un valor en segundos según el tiempo de resistencia a la caída o de duración de la prueba. 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 en el momento que el ratón acumula 3 rotaciones totales a lo largo de la prueba. Para el análisis de

resultados, se seleccionó el mejor valor en una escala de segundos de los 3 intentos realizados según la resistencia a la caída siendo el máximo 300 segundos.

25.2. Evaluación de la exploración en campo abierto.

La prueba de campo abierto (*open field*) se ha utilizado ampliamente para evaluar el comportamiento exploratorio, así como, en la medición de comportamientos emocionales relacionados con la ansiedad (Seibenhener and Wooten 2015). La conducta espontánea de los roedores demuestra una clara aversión a los entornos grandes, iluminados, abiertos y desconocidos, probablemente debido a que filogenéticamente han sido condicionados para ver este tipo de ambientes como peligrosos (Choleris et al. 2001). Estas características están incorporadas en la prueba de campo abierto y forman la base de su uso para la evaluación del comportamiento exploratorio innato de los roedores, sin necesidad de entrenamiento previo.



Figura XII. Any-box[®]

Para la realización de esta prueba se utilizó un núcleo ANY-box[®] (AnyMaze, Stoelting Europe, **Figura XII**) que consiste en: una base sólida de color gris, un sistema ajustable de sujeción perpendicular para sostener una cámara y unos sensores laterales de rayos infrarrojos para seguir el movimiento del animal y detectar sus levantamientos sobre dos patas. Estos sensores están conectados a una interfaz AMi-maze[®] (AnyMaze, Stoelting Europe) para registrar todos los parámetros y posteriormente analizarlos con el software ANY-maze[®] (AnyMaze, Stoelting Europe). Sobre el núcleo ANY-box[®] se colocó un cubículo de plexiglás con paredes opacas (indetectables para el haz de rayos infrarrojos) delimitando una superficie de campo abierto de 40 cm x 40 cm x 35 cm (ancho, profundidad y altura). Los ratones tienen acceso ilimitado a toda la superficie durante 10 minutos iniciando el test en el centro de la superficie a analizar. Esta prueba monitoriza el total de distancia recorrida, número de levantamientos y tiempo de inactividad como parte de la capacidad locomotora general. La thigmotaxis, o la tendencia de los ratones a permanecer cerca de las paredes, se utilizó como medida del comportamiento ansiógeno ya que este comportamiento aumenta a medida que aumentan los niveles de ansiedad (Seibenhener and Wooten 2015; Simon, Dupuis, and Costentin 1994). Para analizar la thigmotaxis como factor de conducta emocional, se analizó el movimiento a lo largo de toda la superficie dividiendo la pista en tres zonas, mediante el software ANY-maze[®], borde o periferia (8 cm de ancho), centro (16 % de la pista total) e intermedio (el área restante).

25.3. Evaluación de la memoria en el reconocimiento de nuevos objetos.

La prueba de reconocimiento de nuevos objetos es una prueba ampliamente utilizada para evaluar la memoria. No obstante, existen numerosas variantes de esta prueba, ampliamente descritas en la bibliografía (Antunes and Biala 2012), en función de los objetos, la forma y dimensiones de la superficie que contiene los objetos, los tiempos o el número de días del protocolo, entre otros factores. Según las características de las variantes se puede evaluar memoria a corto o largo plazo, memoria de trabajo, memoria espacial o espacio-temporal, preferencia por la novedad, etc. Combinando diversos factores se puede examinar si los ratones pueden posteriormente recordar los componentes "qué", "dónde" y "cuándo" de un episodio único, aunque todas las modificaciones de esta prueba siempre se basan en tres pasos: habituación, familiarización y fase de prueba.

En nuestro caso se utilizó esta prueba para evaluar la memoria a corto plazo. Para ello, la prueba se llevó a cabo en una superficie familiar para los animales como la utilizada en la prueba de campo abierto

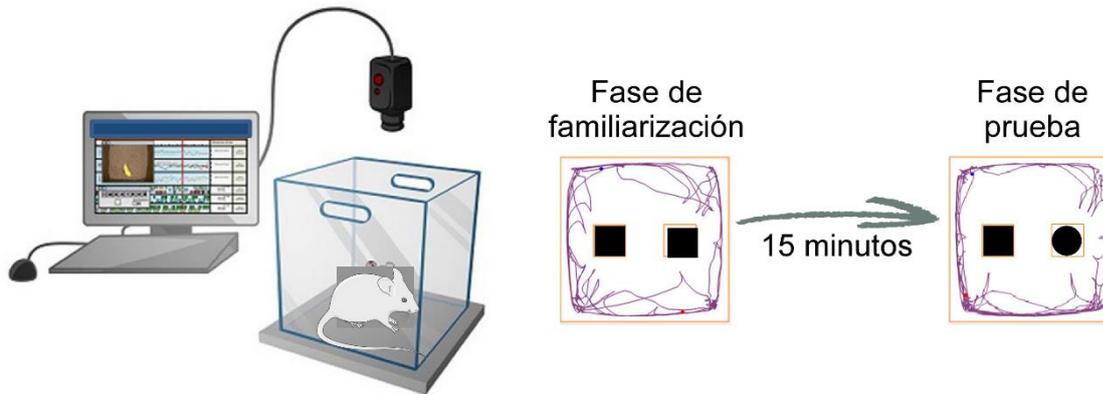


Figura XIII. Representación del protocolo del reconocimiento de nuevos objetos (esfera) en campo abierto para la evaluación de la formación de memoria a corto plazo.

(*open field*) de 40 cm x 40 cm x 35 cm (ancho, profundidad y altura). Se realizaron dos pruebas de campo abierto de 10 min durante dos días consecutivos, para reducir la aversión de los ratones a este espacio (fase de habituación). A continuación, el tercer día se realizó la prueba de reconocimiento de objetos en el centro de la pista de campo abierto a una distancia equidistante según el (Figura XIII).

En primer lugar, durante la fase de familiarización se expuso a los animales ante 2 cubos negros de idénticas proporciones para su exploración durante 5 minutos. Tras 15 minutos de descanso, se evaluó a los mismos ratones sustituyendo uno de los cubos por una esfera del mismo color y proporciones similares para evaluar el tiempo de exploración y la preferencia por la novedad de un nuevo objeto en la fase de prueba. La habilidad de reconocer la esfera como nuevo objeto se determinó mediante el cálculo del índice de discriminación que utiliza la diferencia en el tiempo de exploración para el objeto familiar (t_F), dividiendo este valor por la cantidad total de exploración de sendos objetos [$DI = (t_N - t_F) / (t_N + t_F)$]. Este resultado puede variar entre +1 y -1, donde una puntuación positiva indica más tiempo dedicado al objeto novedoso, una puntuación negativa indica más tiempo dedicado al objeto familiar, y una puntuación cero indica una preferencia nula. Para evaluar la exploración de un objeto se monitorizó el acercamiento del ratón a la periferia del objeto ($\leq 1,5$ cm) con el hocico hacia el objeto, mientras que girarse o sentarse sobre el objeto no se consideró como una exploración.

26. Modelo de daño oxidativo cerebral; tratamiento con ácido 3-nitropropiónico.

La administración intraperitoneal de ácido 3-nitropropiónico (3-NP), a través de su inhibición del complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, se ha descrito que genera estrés oxidativo con origen en este orgánulo y muerte neuronal en el núcleo estriado. La susceptibilidad de las neuronas de este área del cerebro provoca un déficit motor que hace de esta aproximación un buen modelo para el estudio de la enfermedad neurodegenerativa de Huntington (Ramaswamy, McBride, and Kordower 2007; Tunez et al. 2010; Tunez and Santamaria 2009). Se utilizaron ratones adultos (~9 meses de edad) para la administración intraperitoneal de 7 dosis a 50 mg 3NP/kg animal (posología 12 horas). La disfunción motora se evaluó mediante la prueba de Rotarod (*apartado 25.1*). El 3-NP (Sigma-Aldrich Ref. N5636) se preparó fresco, a una concentración *stock* de 25 mg/ml, en PBS estéril y se mantuvo en nevera ≤ 1 semana. El pH de la solución se ajustó a niveles fisiológicos $\sim 7,4$ con NaOH 10 M ($\sim 400-500$ μ l

en 20 ml de solución). Posteriormente, la solución se filtró a través de un filtro de jeringuilla de 0,22 μm en cabina de flujo laminar. De esta manera el volumen de 3-NP del *stock* (25 mg/ml), para una dosis de 50 mg 3NP/kg se determinó según el peso del ratón de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\mu\text{l } 3\text{NP} \left(25 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \left(\text{Peso ratón (g)} \times 10^{-3} \text{kg/g}\right) \times \frac{50 \text{ mg } 3\text{NP}}{\text{Kg}} \times \frac{10^3 \mu\text{l stock } 3\text{NP}}{25 \text{ mg } 3\text{NP}};$$

$$\mu\text{l } 3\text{NP} \left(25 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \text{Peso ratón (g)} \times 2$$

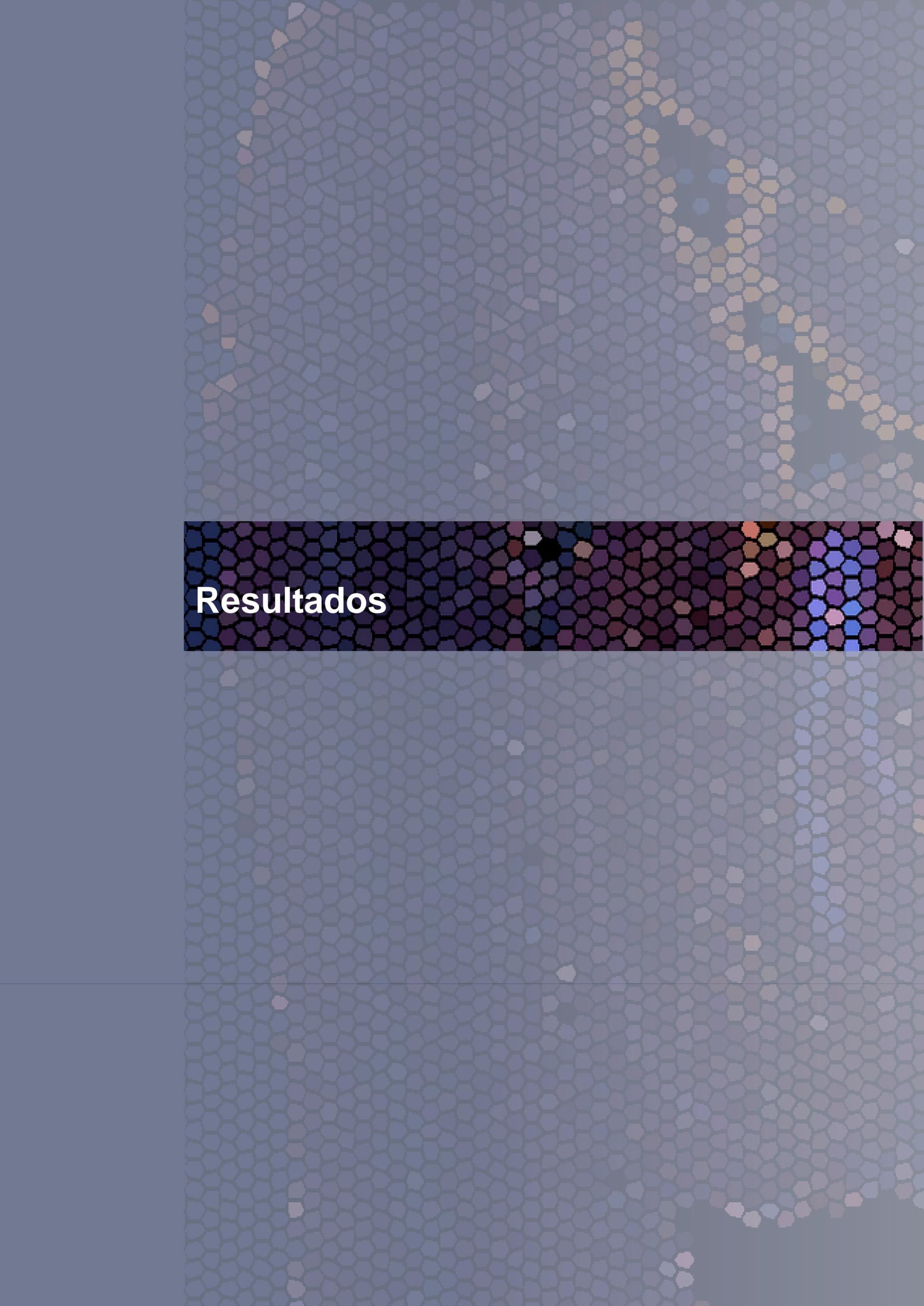
El volumen necesario para cada ratón se completó con PBS estéril para la inyección intraperitoneal de un bolo de 200 μl según la posología previamente indicada.

27. Software y análisis estadístico de los datos.

En cada apartado se ha detallado el software y versión utilizado para la obtención o generación de datos. Para los experimentos adquiridos mediante el citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences), se analizaron de 50.000-100.000 eventos y se utilizaron los programas CellQuest™ y Paint-A-Gate™ PRO (BD Biosciences), además del programa FlowJo X 10.0.7r2 para el análisis de eventos e intensidades de fluorescencia.

Para los experimentos *in vitro* se evaluaron al menos tres réplicas biológicas procedentes de cultivos primarios independientes y las réplicas técnicas necesarias para cada ensayo (típicamente, 3-6 réplicas). En el caso de experimentos con cultivos primarios los astrocitos se procesaron al día 15 *in vitro* (DIV15) y las neuronas a día 7 (DIV7). Los gráficos de barras que se recogen en esta tesis representan la media de los valores \pm error estándar de la media (s.e.m, del inglés, *standard error of the mean*) acompañados de los valores individuales en forma de puntos superpuestos, para una mejor visualización de la dispersión de los datos y el tamaño muestral de réplicas independientes utilizado en cada experimento. Para las cuantificaciones inmunohistoquímicas en muestras de cerebro se utilizaron tres ratones machos por condición. Para los experimentos que involucran el comportamiento y los que requieren muestras *in vivo* o *ex vivo*, se utilizaron ratones machos y en cada apartado correspondiente se especifican el número y la edad de los animales.

Las comparaciones estadísticas entre dos grupos de valores se realizaron utilizando la prueba t de Student bilateral, en el caso de comparaciones múltiples se determinó el análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Bonferroni. En todos los casos, los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando Microsoft Excel o el software IBM SPSS Statistics.



Resultados

1. Estrategia mitoCatalasa (mCAT). Desarrollo de un nuevo modelo de ratón para el estudio de la señalización redox astrocítica en el cerebro.

Este trabajo plantea el estudio de la función fisiológica de las especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales (mROS) en el sistema nervioso central, así como la comprensión del sentido funcional de los altos niveles de mROS en los astrocitos con respecto a las neuronas (Lopez-Fabuel et al. 2016). La investigación del papel fisiopatológico de los mROS en ocasiones ha apostado por mecanismos que los incrementan, lo que a nuestro entender dificulta estudiar su papel funcional en favor de su acción deletérea mROS. Por eso, hemos decidido utilizar una estrategia que nos permita reducir la abundancia total de ROS para estudiar las funciones alteradas tras la reducción de sus niveles en lugar de su ausencia. Durante la *Introducción* de este trabajo se han detallado las limitaciones de algunos de estos modelos, así como la complejidad de la señalización redox. Por estos motivos hemos generado un nuevo modelo de ratón que nos permita reducir los niveles endógenos de ROS dirigiendo, mediante una estrategia genética, la enzima catalasa a la mitocondria (mito-catalasa, abreviado como *mCat* o mCAT para su gen o proteína, respectivamente), orgánulo principal responsable de la producción de ROS. Esta enzima es una oxidorreductasa que cataliza la descomposición específica del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno molecular y agua.

Estudios previos en nuestro laboratorio, demostraron la eficiencia de la sobreexpresión del sistema mCAT para reducir los niveles ROS en cultivos primarios de fibroblastos (MEFs, del inglés, *mouse embryonic fibroblasts*) y astrocitos de ratón. En ambos casos se demostró la correcta expresión de la mito-Catalasa y su eficacia. Además, se evaluó la capacidad de reducir niveles de H₂O₂ exógeno en mitocondrias previamente aisladas de células transfectadas con el plásmido de *mCat*. (Tesis doctoral Dr. Nicolás Bonora)

Una vez demostrada la eficacia y eficiencia del sistema mCAT para obtener una expresión constante, estable y constitutiva de la proteína mCAT no dependiente de transfección, generamos un nuevo modelo genético de ratón para expresar mCAT de manera endógena. Para ello, se insertó mediante recombinación homóloga en el locus *Rosa26* el ADN complementario (en inglés, *cDNA*) completo de la catalasa de ratón [NP_033934.2] en fase con: 1) la secuencia de localización mitocondrial de la subunidad VIII de la citocromo c oxidasa (C8) para garantizar el procesamiento mitocondrial de la nueva proteína y 2) un fragmento del gen de la hemaglutinina (HA) que utilizamos como *tag* o “marcado” para facilitar la detección de la proteína mCAT codificada en esta construcción. El control de la expresión de esta construcción se encuentra bajo la influencia del promotor *CAG* (del inglés, *chicken-actin promoter/CMV enhancer*). Uno de los objetivos de esta estrategia es poder ejercer un control espacio-temporal de la expresión de mCAT para estudiar sus efectos en función del tipo celular y a lo largo de la edad del ratón. Por este motivo, la construcción *knock-in mCat* incorpora, tras el promotor, un cassette de STOP transcripcional flanqueado por sitios *LoxP* para controlar su expresión mediante la acción de una *Cre* recombinasa. De acuerdo a la nomenclatura oficial, hemos generado un nuevo ratón *knock-in condicional* C57BL/6J-Gt(ROSA)26Sor^{tg(PCAG-loxPstoploxP-mt-Cat)} que simplificamos de la manera *mCat^{LoxP}/+*, para reflejar que trabajamos en heterocigosis con una sola copia del transgén.

Para los experimentos *in vitro* los animales condicionales *mCat^{LoxP}/+* se cruzaron con animales C57BL/6J con una expresión constitutiva de una *Cre* recombinasa gobernada bajo el promotor ubicuo de citomegalovirus (C57BL/6J-*CMV-Cre*/+). Los animales mCAT descendientes de este cruce se retro-

cruzaron (cruces sucesivos con un parental genéticamente idéntico) con animales C57BL/6J para constituir una línea genéticamente estable de ratones que expresan mitoCatalasa de manera constitutiva y ubicua en todos los tejidos (en adelante, mCAT, para los ratones heterocigotos *mCat*+/+, en referencia al ratón o células primarias derivadas de éste). De los animales neonatos (0-24h) descendientes de los cruces resultantes de ratones mCAT (*mCat*+/+) con C57BL/6J *wild type* (WT o +/+) obtuvimos las células necesarias para hacer los experimentos con cultivos primarios de astrocitos cuya caracterización y demostración de nuestra hipótesis de trabajo se destacará en los siguientes apartados. Todos los experimentos realizados con astrocitos mCAT han sido comparados con muestras WT obtenidas simultáneamente de hermanos de camada, las cuestiones técnicas han sido desarrolladas previamente en el apartado de *materiales y métodos* (Figura 1).

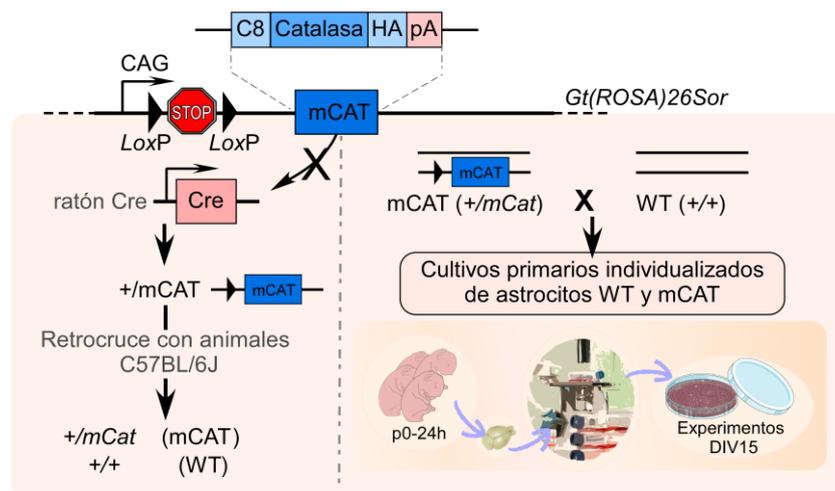


Figura 1. Generación del ratón constitutivo mitoCatalasa (mCAT) utilizado para la obtención astrocitos corticales en cultivo primario. A la izquierda, representación esquemática de la estrategia utilizada para generar ratones que expresan de forma constitutiva una forma de catalasa dirigida a la mitocondria (mCAT). Estos ratones se obtuvieron mediante el cruce de los ratones mCAT condicionales (*mCat^{LoxP}*) con ratones Cre recombinasa que promueven la activación constitutiva del evento de recombinación mediada por la Cre recombinasa. C8, secuencia de procesamiento mitocondrial de citocromo c oxidasa subunidad VIII-; HA, fragmento de la hemaglutinina humana; CAG, promotor ubicuo de CAG (del inglés, *chicken-actin promoter/CMV enhancer*); STOP, señal transcripcional de STOP; pA, señal hGH polyA que promueve tanto la poliadenilación como la terminación; *LoxP*, sitios de reconocimiento de la enzima Cre recombinasa. A la derecha, esquema simplificado de la obtención de cultivos de astrocitos primarios obtenidos de neonatos (0-24h), el uso de cruces de ratones *wild type* (WT, +/+) con ratones mCAT (*mCat*+/+), nos garantiza el 50% de ambos genotipos en la descendencia y nos obliga a realizar cultivos individualizados. Los astrocitos mCAT y WT obtenidos de hermanos de camada han sido caracterizados en paralelo.

2. La expresión de mitoCatalasa es un sistema eficiente para la correcta reducción de los niveles endógenos de mROS en astrocitos *in vitro*.

La expresión ubicua de nuestro sistema en el modelo mCAT constitutivo, nos permite trabajar con cualquier tipo celular que teóricamente presentará una reducción en sus niveles de mROS endógenos. Para poder resolver nuestra hipótesis de trabajo, evaluamos esta premisa en astrocitos primarios obtenidos de neonatos (0-24h) de cruces de ratones mCAT y C57BL/6J.

En primer lugar, se evaluó la expresión de la proteína catalasa mediante inmunodetección en transferencias de tipo *western blot* en extractos de cultivos de astrocitos +/mCAT y su contrapartida

control +/+ (mencionados en adelante, como mCAT y WT, respectivamente). De acuerdo con lo esperado, se observaron niveles altamente superiores (~6 veces) de la proteína catalasa en los extractos totales de astrocitos mCAT, que se corresponden a la expresión de la construcción de *mCat* como demuestra la detección del *tag* HA en estas muestras (**Figura 2a**). En el siguiente paso, tras un sub-fraccionamiento celular de las muestras de astrocitos, demostramos que la expresión de HA y, por tanto, la proteína mCAT, se encuentra en la fracción mitocondrial (**Figura 2b**). La banda correspondiente al *tag* HA en la fracción citosólica de estas purificaciones de mitocondrias podría corresponder a impurezas del método, así como a la síntesis de la proteína en el citosol antes de su traslocación a la mitocondria ordenada por su secuencia de localización. Para evaluar la localización mitocondrial de mCAT se evaluó además el patrón de expresión del *tag* HA mediante inmunofluorescencia en cultivos primarios de astrocitos mCAT y WT (**Figura 2c**). El marcaje de HA mediante inmunohistoquímica se observó claramente de forma única en los astrocitos +/mCAT. Su distribución perinuclear y citoplasmática junto con patrón punteado del marcaje confirma la localización mitocondrial de la proteína mCAT. No obstante, la presencia de mCAT en la mitocondria quedó validada al demostrar suco-localización con proteínas típicamente mitocondriales (**Figura 2d**).

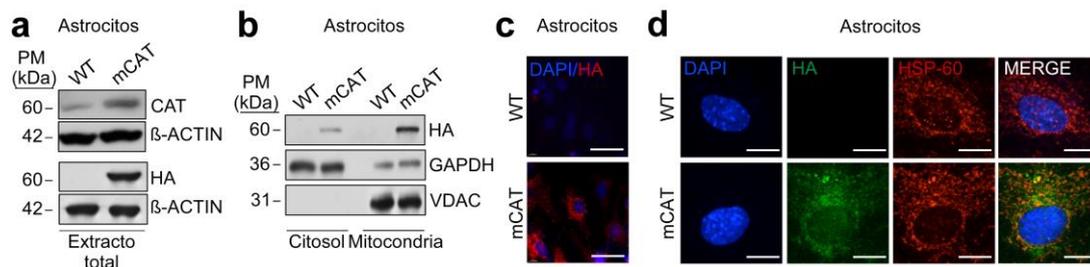


Figura 2. Expresión mitocondrial de la proteína mCAT en astrocitos corticales en cultivo primario.

Inmunodetección mediante transferencia tipo *western blot* de la expresión de catalasa marcada mitocondrialmente en extractos de proteína total de astrocitos (**a**) y de mitocondrias aisladas de éstos (**b**) para demostrar su localización subcelular y expresión exclusiva en las muestras mCAT. Los astrocitos mCAT presentan mayor abundancia de la proteína catalasa, que a juzgar por la detección del *tag* HA correspondería a la expresión de la proteína mCAT. β -Actina se utilizó como control de carga. (**c**) La imagen de inmunofluorescencia muestra el patrón de expresión del *tag* HA fusionado a mCAT y, (**d**) su co-localización con el marcador mitocondrial (HSP-60) exclusiva de astrocitos mCAT. Barras de escala, 100 y 25 μ m, respectivamente. HSP-60, *Heat shock protein-60*.

Todos los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Una vez evaluada la correcta expresión de la construcción *mCat*, el siguiente paso fue confirmar la funcionalidad de este sistema para disminuir los niveles de mROS. Para la detección de ROS contamos con diferentes métodos y sondas disponibles comercialmente. No obstante, existe una gran diversidad de herramientas con el mismo objetivo que tratan de tener en cuenta la especificidad de estas sondas por los diferentes tipos de ROS, los límites de sensibilidad, la localización subcelular o las diferencias técnicas en los protocolos de medida. Durante el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral, nos hemos decantado por una batería de pruebas, que en conjunto nos permitan confirmar de forma robusta la disminución de mROS endógenos en los astrocitos mCAT.

Para la medida de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en astrocitos hemos utilizado la sonda fluorescente Amplex® Red, que reacciona de manera específica con este tipo de ROS con una estequiometría 1:1. La medida de la cinética de oxidación de Amplex® Red en astrocitos intactos mCAT y WT, así como con mitocondrias aisladas de éstos, demostró una bajada de H_2O_2 próxima al 30% en ambos casos (**Figura**

3a). El resultado obtenido con mitocondrias aisladas nos sugiere que esta reducción, en ambos casos, podría deberse a una disminución de los ROS mitocondriales (mROS), debido a que los niveles de H_2O_2 mitocondriales pueden ser elevados por la actividad de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) convirtiendo $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 .

Como se ha mencionado en la *introducción* el tipo principal de ROS de origen mitocondrial es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), producido principalmente en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial. Para evaluar específicamente el $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial se utilizó la sonda MitoSOX™ Red. Esta sonda fluorescente derivada del bromuro de etidio es permeable a la célula y accede fácilmente a la mitocondria a favor de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) gracias a un grupo catiónico presente en su molécula. La excitación de esta sonda por $O_2^{\cdot-}$ produce una modificación con un espectro de emisión de fluorescencia característico que puede ser monitorizado. En nuestro caso, la cuantificación de fluorescencia se realizó mediante citometría de flujo en cultivos primarios de astrocitos. De esta manera, los astrocitos mCAT resultaron tener una reducción del 22% en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ respecto a los WT (**Figura 3b**). Paralelamente, para descartar que las diferencias observadas en los niveles de MitoSOX™ se debieran a diferencias en la cantidad de sonda incorporada, se evaluó de manera independiente el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Este ensayo se llevó a cabo en condiciones similares a las realizadas con MitoSOX™, mediante la sonda fluorescente MitoProbe™ DiIC₁(5) y el agente desacoplante del gradiente de electrones mitocondrial como el CCCP (del inglés, *carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone*). No se observaron diferencias significativas en la medida de $\Delta\Psi_m$ (**Figura 3b**) lo que refuerza el resultado obtenido con MitoSOX™ sobre la reducción de mROS. A su vez, este dato sugiere que el sistema mCAT no altera el estado funcional de la mitocondria (Green and Van Houten 2011).

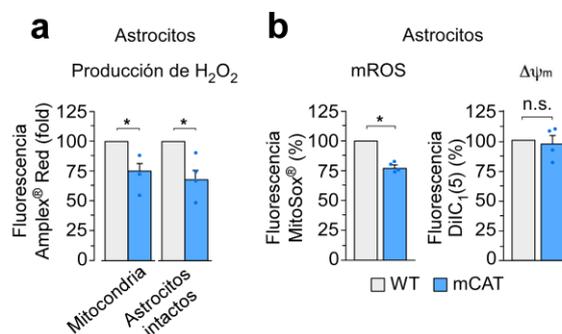


Figura 3. La expresión mitocondrial de la proteína mCAT reduce los niveles endógenos de mROS en astrocitos corticales en cultivo primario.

(a) La detección de la cinética de liberación de H_2O_2 mediante la detección fluorimétrica de la sonda Amplex®Red determinó que los astrocitos primarios mCAT disminuyen el H_2O_2 producido endógenamente en las mitocondrias y en células intactas (datos absolutos del WT, 2,6 y 16,7 $pmol\ h^{-1}\ \mu g\ protein^{-1}$, respectivamente). Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. tras normalizar los valores WT a 100 * $P < 0,05$ n.s., no significativo ($n=3$ o 4 muestras biológicamente independientes, respectivamente; prueba t-Student). (b) El análisis de citometría de flujo determinó que la expresión de mCAT redujo un 25% los ROS mitocondriales (mROS) en astrocitos mCAT evaluados mediante la sonda MitoSox®, sensible a anión superóxido, mientras que el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) permaneció sin cambios. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. tras normalizar los valores WT a 1 * $P < 0.05$ ($n=4$; prueba t-Student).

Otra aplicación del modelo mCAT es el estudio del efecto deletéreo de los ROS en situaciones de estrés oxidativo. Para comprobar la eficacia del sistema mCAT para combatir niveles tóxicos de ROS

hemos seguido dos tipos de estrategias. En la primera de ellas, se evaluó la capacidad catalítica de la enzima mCAT en mitocondrias aisladas de astrocitos WT y mCAT incubadas con diferentes concentraciones exógenas de H_2O_2 . Los resultados de la **Figura 4a** de nuevo demuestran que las mitocondrias aisladas de los astrocitos mCAT son capaces de neutralizar el H_2O_2 más eficientemente que las aisladas de los WT. En la condición mCAT tras 5 minutos, los niveles de H_2O_2 exógeno se redujeron a la mitad en todas las concentraciones evaluadas y fueron totalmente neutralizadas tras 20 minutos. En la segunda estrategia, para evaluar el sistema mCAT frente a una situación patológica asociada a estrés oxidativo, se realizó una medida de ROS mediante Amplex® Red en astrocitos primarios intactos tratados con distintos inhibidores de la cadena de transporte mitocondrial. En la **Figura 4b** se puede observar como el método es capaz de detectar un incremento de la producción de ROS tras los tratamientos de los astrocitos WT con antimicina A o oligomicina, inhibidores del Complejo III o la ATPasa, respectivamente. Sin embargo, no observamos el esperado incremento de ROS tras el bloqueo del Complejo I con rotenona que ya habíamos observado anteriormente el caso particular astrocitos utilizando Amplex® Red no así cuando utilizamos MitoSOX™ Red en condiciones similares (Lopez-Fabuel et al. 2016). Estos resultados demuestran la que los astrocitos mCAT reducen significativamente los niveles de ROS en todas las situaciones planteadas lo que pone en evidencia la capacidad de este modelo no sólo para el estudio del papel fisiológico de los ROS en condiciones basales, sino también como una herramienta genética para combatir el estrés oxidativo en modelos de patología.

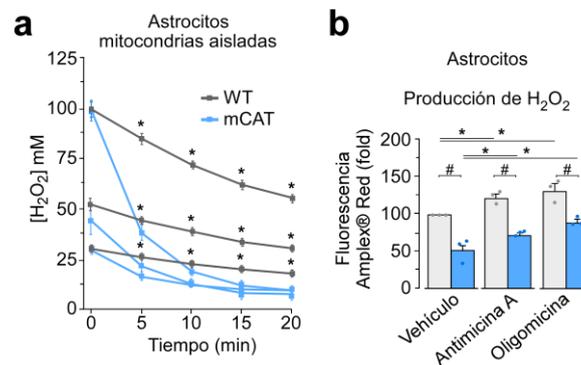


Figura 4. La expresión mitocondrial de la proteína mCAT es capaz de detoxificar niveles tóxicos de ROS en astrocitos corticales en cultivo primario. (a) Las mitocondrias aisladas de los astrocitos mCAT detoxifican el H_2O_2 añadido exógenamente, detectado colorimétricamente, de forma más eficaz que las células del control. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. * $P < 0,05$ ($n=3$; prueba t-Student). **(b)** La detección fluorimétrica de la sonda Amplex® Red determinó que los astrocitos primarios mCAT protegen del incremento de ROS originado tras la inhibición de la cadena de transporte de electrones. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. tras normalizar los valores WT condición vehículo a 100 #, *, $P < 0,05$ ($n=3$; prueba t-Student).

3. La disminución de mROS en los astrocitos mCAT no induce daños drásticos en la biología celular de estos astrocitos.

El estrés oxidativo es una situación de desequilibrio que suele asociarse con situaciones patológicas y se refiere a niveles intracelulares elevados de ROS bien por un desbalance en la producción de éstos, o bien por alteraciones en la defensa antioxidante. Sin embargo, como se ha detallado en la *introducción*, recientemente se han explorado los ROS como moléculas de señalización en el mantenimiento de diversas funciones fisiológicas, un proceso denominado biología redox (Angelova and Abramov 2016;

Kira M Holmström and Finkel 2014; Schieber and Chandel 2014). La biología redox sostiene que se requieren pequeños aumentos en los niveles de ROS para activar vías de señalización donde los ROS funcionarían como segundos mensajeros en estas cascadas de señalización.

Así, un aspecto del equilibrio redox es la defensa antioxidante y para evaluar si la respuesta antioxidante de los astrocitos mCAT se encuentra alterada previamente hemos estudiado el factor de transcripción NRF2 (del inglés, *nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2*), principal sensor y modulador del estado redox celular (Esteras et al. 2016; Hashimoto 2018; Neves Carvalho et al. 2017; Sandberg et al. 2014b; Zhang et al. 2016). La caracterización de esta vía realizada por el Dr. Nicolás Bonora en nuestro laboratorio, durante sus tesis doctoral mostró una disminución en la traslocación de NRF2 al núcleo, donde este factor de transcripción moduló la expresión de diversos genes diana que contienen dominios de respuesta antioxidante (en inglés, ARE de *antioxidant response elements*). Así, se observaron disminuciones en la expresión de una batería de sus genes diana como NADPH quinona deshidrogenasa 1 (*Nqo1*), glutamato-cisteína ligasa (*Gclc*), glutatión peroxidasa-2 (*Gpx2*), hemo-oxigenasa 1 (*Ho-1*), tiorredoxina-1 (*Trx1*), peroxirredoxina-1 (*Prdx1*), además del propio gen de *Nrf2* que participan en la defensa antioxidante celular.

En este trabajo nos propusimos investigar la presencia de huellas de daño en el ADN relacionadas con estrés oxidativo (Wang et al. 2018). Para ello, se empleó un método fluorescente para detectar, mediante citometría de flujo, residuos de 8-oxoguanina (una de las principales modificaciones inducidas en el ADN causadas por ROS y fuente de mutaciones). De acuerdo con los resultados de la **Figura 5a** no se observaron diferencias significativas en los niveles de marcaje detectados. Además, cabe destacar que los niveles de marcaje positivo fueron muy bajos probablemente debido a que se estudiaron astrocitos primarios y en unas condiciones basales de cultivo estándares en presencia de antioxidantes en el medio de cultivo. Se utilizó un tratamiento agudo con H_2O_2 como control positivo de la medida de daño oxidativo para este ensayo.

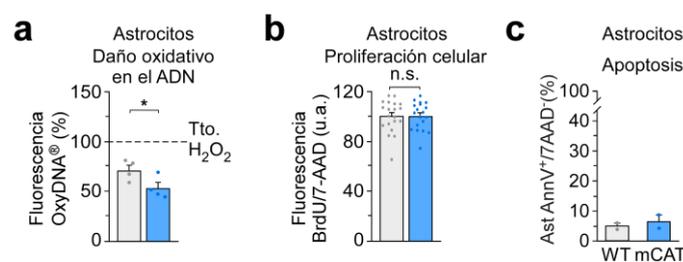


Figura 5. La disminución de mROS endógenos en astrocitos mCAT reduce los niveles basales de

daño oxidativo en el ADN y no compromete su viabilidad o ciclo celular. El análisis de citometría de flujo de (a) los niveles de residuos de 8-oxoguanina (OxyDNA®) determinó una reducción del 25% de esta modificación oxidativa del ADN en los astrocitos mCAT. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. tras considerar 100 el valor de astrocitos WT tratados con H_2O_2 (100 μ M, 15 min) *P<0,055 (n=4; prueba t-Student). (b) Los niveles de incorporación del análogo de nucleótido bromo-deoxiuridina (BrdU), no detectaron una alteración en la proliferación. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. *P<0,05 n.s., no significativo (n=3 experimentos independientes, se representan las réplicas de cada experimento; prueba t-Student). (c) Los niveles de apoptosis (eventos Anexina V-APC⁺/7-AAD⁻) no se vieron alterados en condiciones basales. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. (n=2).

Por otro lado, se sabe que la señalización mediada por ROS puede influir en la proliferación celular (Burdon 1995), diferenciación celular de progenitores (Le Belle et al. 2011; Bigarella, Liang, and Ghaffari

2014), la activación de astrocitos y su consecuente proliferación ante una respuesta antiinflamatoria (Angelova and Abramov 2016; Sheng et al. 2013). Para evaluar si la disminución de los mROS altera la proliferación, se evaluó la incorporación de bromo-deoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina, al ADN. El BrdU incorporado, durante la fase de síntesis de ADN del ciclo celular, se marcó específicamente con un anticuerpo fluorescente anti-BrdU-APC y se determinó mediante citometría de flujo. Simultáneamente, los astrocitos se marcaron con la sonda 7-amino-actinomicina D (7-AAD) un marcador de ADN total. Con esta combinación, la citometría de flujo de doble marcaje nos permite caracterizar las células que están sintetizando ADN (según la incorporación de BrdU) en los distintos puntos del ciclo celular (G0, G1, S o G2/M). La **Figura 5b** muestra que no hubo diferencias en la incorporación de BrdU indicando la ausencia de diferencias en la proliferación celular.

Por último, dado que la modulación redox altera la apoptosis (Circu and Aw 2010; Li et al. 2003) determinamos los niveles basales de apoptosis. El marcaje con 7-AAD realizado durante el experimento de incorporación de BrdU nos permite analizar la fracción de células o eventos correspondientes a fragmentos de éstas, cuyo marcaje de ADN es inferior al de la población en fase G0/1. Esta fracción corresponde a células apoptóticas y en dicho experimento apenas se observó este tipo de eventos. Además, como se muestra en la **Figura 5c** los niveles de apoptosis detectados en las condiciones basales de cultivo, analizados mediante el reconocimiento de células con marcaje anexina V positivo/7-AAD negativo, fueron mínimas y no se observaron diferencias significativas tras la modulación endógena de los mROS astrocíticos. En su conjunto, la disminución de mROS endógenos en astrocitos no compromete funciones celulares como viabilidad, ciclo celular o modificaciones del ADN.

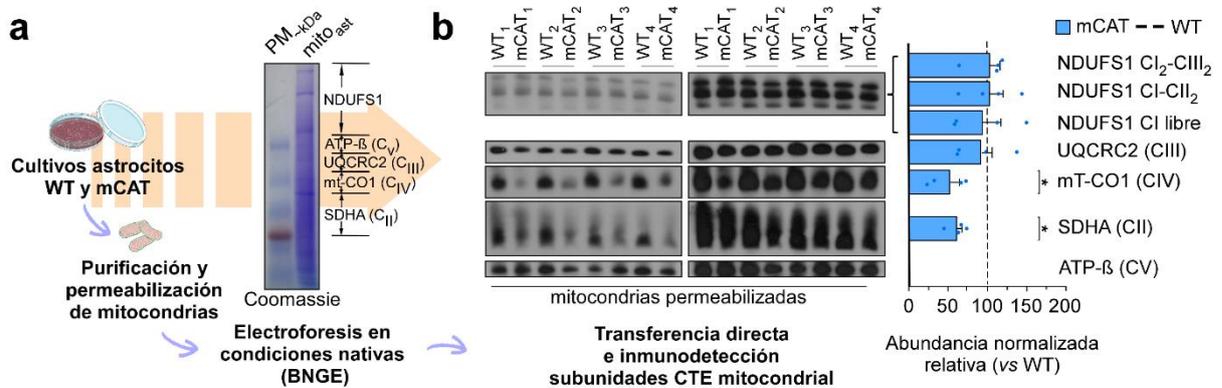
4. La disminución de mROS en los astrocitos mCAT es suficiente para modular diversos aspectos de la configuración metabólica característica de los astrocitos primarios y la homeostasis neuronal.

Dado el interés de nuestro laboratorio en el metabolismo del sistema nervioso central nos centramos en aspectos metabólicos y su relación con los niveles de ROS. Por eso, en los siguientes apartados estudiamos la influencia de la disminución de mROS en algunos de los procesos más característicos del metabolismo astrocítico, además, de su repercusión en la homeostasis neuronal.

4.1. Influencia de la señalización redox astrocítica en la biología mitocondrial de los astrocitos: Configuración de la CTE, funcionalidad y carga mitocondrial.

Debido a que la acción de la enzima mCAT tiene lugar en la mitocondria decidimos estudiar si existía alguna alteración de parámetros mitocondriales de interés. Previamente, en la **Figura 3b** comprobamos que los mROS astrocíticos basales no tienen efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial que es un parámetro a menudo utilizado como referencia del estado bioenergético de este orgánulo (Green and Van Houten 2011). Para estudiar otros aspectos más concretos, se realizó un escrutinio de los complejos que forman parte de la cadena de transporte de electrones (CTE). Así, exploramos la relación que los mROS astrocíticos mantienen con la ultra-estructura de la CTE basándonos en la abundancia de algunas de las subunidades más características (Lopez-Fabuel et al. 2016). Para ello, primero se aislaron mitocondrias de astrocitos WT y mCAT y tras su permeabilización con digitonina, las muestras se cargaron en un gel nativo para conseguir una separación no desnaturalizante de proteínas (**Figura 6a**). La **Figura 6b** muestra los resultados de la transferencia directa de estos geles para la inmunodetección de las

subunidades NDUFS1, SDHA, UQCRC2 y MT-CO1, pertenecientes a los complejos I, II, III y IV, respectivamente. Se utilizó la subunidad β de la ATPasa como control de carga para normalización de la abundancia relativa de las subunidades mencionadas. Como muestra la cuantificación, se observó una reducción significativa de las subunidades de los complejos II y IV en las mitocondrias aisladas de astrocitos mCAT.



La formación de supercomplejos favorece la eficiencia energética y reduce la formación de ROS, por lo que este fenómeno puede contribuir a la señalización redox. La **Figura 7a** muestra la proporción de complejo I asociada a supercomplejos con respecto a la proporción libre. Este ratio es relevante para entender la eficiencia electrónica a través del complejo I. Una menor proporción de complejo I libre, como la observada en los astrocitos mCAT, favorecería una mayor eficiencia electrónica y una menor producción de mROS. A pesar de que la tendencia no es estadísticamente significativa, este resultado corresponde a una subunidad de las 44 que conforman el complejo I. Para estudiar si la preferencia en la formación de supercomplejos tenía consecuencias funcionales, medimos la actividad del complejo I. Los resultados de la **Figura 7b** advierten de una tendencia al incremento en la actividad. La variabilidad de este método es alta y su precisión es más cualitativa que cuantitativa, sin embargo, ofrece la ventaja de poder observar independientemente la actividad de los supercomplejos y del complejo I libre lo que pone en evidencia las diferencias de actividad entre estos. Por último, se midió la actividad específica NADH deshidrogenasa de este complejo mitocondrial en muestras de mitocondrias aisladas de astrocitos WT y mCAT como se muestra en la **Figura 7c**, se observó un incremento, estadísticamente significativo, cercano al 20%, en la actividad del complejo I en los astrocitos mCAT.

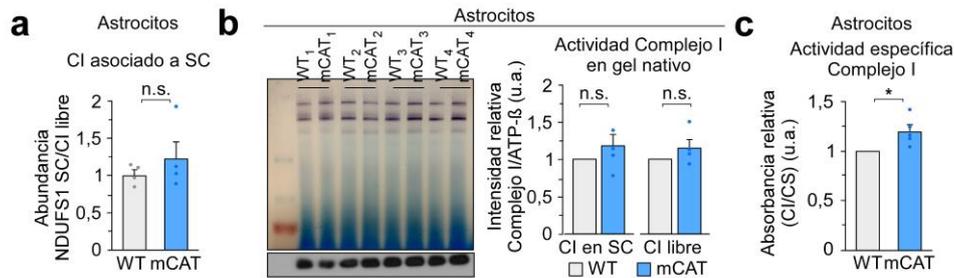


Figura 7. La disminución de mROS endógenos en astrocitos mCAT incrementa la actividad específica del complejo I de la CTE. (a) Proporción de Complejo I (C-I) asociado a supercomplejos (SC), según ratio de abundancia de NDUFS1 en las bandas de SC respecto al detectado libre. (b) La actividad NADH deshidrogenasa del C-I determinada en BNGE en muestras aisladas de mitocondria reveló un incremento no significativo (n.s.) (c) Determinación de la actividad específica del C-I mediante espectrofotometría diferencial del NADH, tras la adición de 50 μ M de ubiquinona, y posterior adición de 10 μ M de rotenona (Δ Absorbancia de NADH/min). Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. tras normalizar a 1 los valores de las muestras WT * $P < 0,05$ (n=4 y 5, respectivamente; prueba t-Student).

Dado que los mROS parecen modular la cadena de transporte de electrones, evaluamos el consumo de oxígeno. La **Figura 8a** muestra una disminución significativa en la cinética de consumo de oxígeno por los astrocitos mCAT, determinado mediante una sonda fluorescente sensible al oxígeno disuelto en el medio (Jonckheere et al. 2010; Will et al. 2007). Para estudiar si estos cambios se deben a una pérdida de masa mitocondrial, se evaluó la carga mitocondrial de los astrocitos WT y mCAT. Para ello, medimos el número de copias de ADN mitocondrial (ADN_{mt}), un proceso altamente controlado dentro de cada tipo celular (Aryaman, Johnston, and Jones 2019). Por eso, la determinación del número de copias es un parámetro ampliamente utilizado para evaluar patologías mitocondriales y se suele asociar con la masa mitocondrial. El panel de la izquierda de la **Figura 8b** muestra que la modulación de mROS astrocíticos no modifica el número de copias de ADN_{mt} a juzgar por la determinación mediante qPCR de genes mitocondriales codificados en el ADN mitocondrial o nuclear.

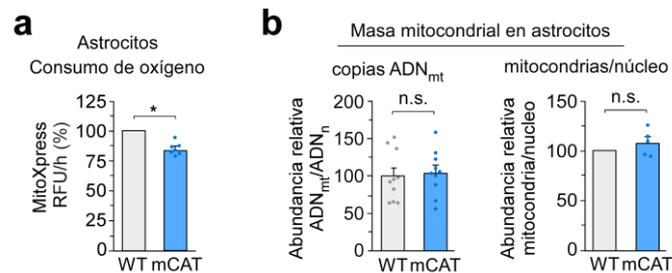


Figura 8. La disminución de mROS endógenos en astrocitos mCAT altera su consumo de oxígeno sin alterar su carga mitocondrial. (a) Consumo de oxígeno en astrocitos intactos mediante la sonda fluorescente MitoXpress, sensible a oxígeno. Los datos son expresados como la media de la pendiente de la cinética de consumo de oxígeno en una atmosfera sellada mediante aceite mineral durante 2 horas \pm s.e.m. tras normalizar a 100 los valores de las muestras WT * $P < 0,05$ (n=7; prueba t-Student). (b) La carga mitocondrial se evaluó mediante 2 métodos; 1) A la izquierda, mediante qPCR se evaluó la expresión relativa de genes mitocondriales; *mt-Co2* (citocromo oxidasa subunidad 2 mitocondrial) y *Sdh* (succinato deshidrogenasa), codificados por ADN mitocondrial (ADN_{mt}) y nuclear (ADN_n), respectivamente ($Co2/Sdh = ADN_{mt}/ADN_n$) y 2) a la derecha, mediante citometría de flujo la fluorescencia de la sonda mitocondrial Cytopainter se normalizó respecto al ADN total determinado mediante marcaje con 7-AAD. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. tras normalizar a 100 los valores de las muestras WT * $P < 0,05$ n.s. no significativo (n=10 y 4, respectivamente; prueba t-Student).

Como medida adicional, en el panel de la derecha de la **Figura 8b** se evaluó, con idéntico resultado, la señal de una sonda mitocondrial frente a la cantidad estable de ADN en cultivos de astrocitos confluentes mediante citometría de flujo.

4.2. Influencia de la señalización redox astrocítica en el metabolismo glucídico de los astrocitos.

Dada la importancia de los astrocitos en la homeostasis energética cerebral (Mächler et al. 2016; Magistretti 2011; Magistretti and Allaman 2015; Nortley and Attwell 2017; Pellerin et al. 2007; Pellerin and Magistretti 2012) decidimos investigar el posible efecto de la disminución de los mROS en el metabolismo glucídico de los astrocitos. En primer lugar, se evaluó la liberación de lactato al medio producido por los cultivos de astrocitos, como una medida indirecta de la actividad glucolítica. Como muestra la **Figura 9a**, los astrocitos mCAT muestran una reducción estadísticamente significativa del 30% del lactato liberado. Se realizó un experimento similar para evaluar la reserva glucolítica, definida como la diferencia entre los niveles de glucólisis basal y la máxima capacidad glucolítica alcanzada tras la inhibición de la cadena de transporte de electrones. La **Figura 9b** muestra que los astrocitos mCAT tienen una respuesta glucolítica superior tras el bloqueo mitocondrial lo que sugiere que la reducción basal de lactato no es una pérdida de su capacidad glucolítica. No se investigó el mecanismo por el cual la inhibición de la respiración mitocondrial conduce a la estimulación glucolítica sin embargo, es posible que se deba a la activación de la fosfofructoquinasa 1 a la baja relación ATP/ADP inducida tras el bloqueo mitocondrial (Almeida et al. 2001).

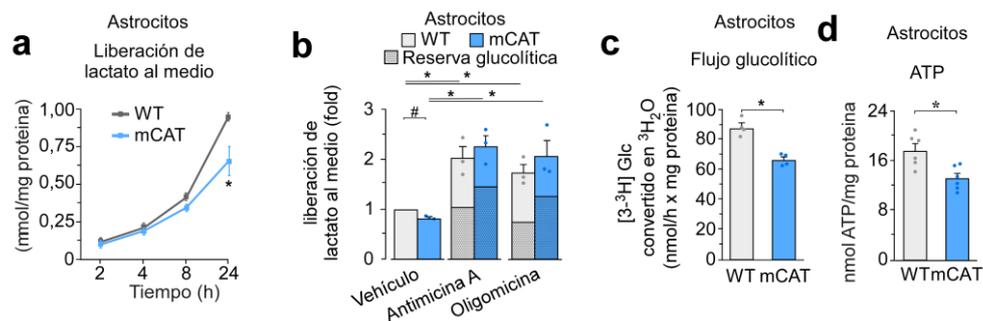


Figura 9. La disminución de mROS endógenos en astrocitos mCAT disminuye el consumo de glucosa por la vía glucolítica. (a) La determinación enzimática de la cinética de liberación de lactato determinó una disminución de los niveles de lactato en los cultivos de astrocitos mCAT significativa a las 24h del cambio de medio. (b) Se comprobó, a las 24h, que la disminución de liberación de lactato en condiciones basales mCAT, no es debida a una pérdida de capacidad glucolítica, como demuestran los niveles de liberación máxima alcanzados por los astrocitos WT y mCAT tras la inhibición de la CTE mitocondrial. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. tras normalizar a 1 los valores de las muestras WT basal. #, *, $P < 0,05$ ($n=3$ y 4 , respectivamente; prueba t-Student) (c) El flujo glucolítico, determinado mediante la producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ a partir del consumo de $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-glucosa}$ en cultivos de astrocitos intactos, reveló un descenso del 25% significativo tras la reducción de mROS en los astrocitos mCAT. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. * $P < 0,05$ ($n=4$; prueba t-Student). (d) Los astrocitos mCAT mostraron una disminución de los niveles de ATP detectada mediante luminiscencia en extractos totales de astrocitos en base a una recta patrón. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. * $P < 0,05$ ($n=6$; prueba t-Student).

Para dilucidar si estas diferencias en la liberación de lactato se debían a cambios en la ruta glucolítica analizamos la conversión de $[3\text{-}^3\text{H}]\text{glucosa}$ en $^3\text{H}_2\text{O}$ que es un método más específico de la determinación de la actividad glucolítica (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009). Este experimento recogido en la **Figura 9c** demuestra una reducción del 25% de la actividad

glucolítica de los astrocitos mCAT. Este resultado junto con el observado descenso en respiración sugiere que los mROS podrían modular la disponibilidad de ATP. Los resultados de la **Figura 9d** muestran una disminución significativa de los niveles de ATP en los astrocitos mCAT.

De acuerdo con la noción de que la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato (PPP, del inglés *pentose-phosphate pathway*) son vías mutuamente afectadas en varios paradigmas experimentales (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009), decidimos estudiar la actividad de la vía PPP. Para ello, evaluamos la tasa de producción de $^{14}\text{CO}_2$ por los astrocitos mCAT incubados en presencia de $[1-^{14}\text{C}]$ -glucosa que se descarboxila en la vía PPP y en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). Como se muestra en la **Figura 10a** (panel izquierdo), la producción de $^{14}\text{CO}_2$ procedente de $[1-^{14}\text{C}]$ -glucosa aumentó significativamente en la condición mCAT. Sin embargo, la tasa de oxidación de $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa, que tiene lugar exclusivamente en el TCA, no se vio afectada (**Figura 10a**, panel central). Así, la diferencia entre las tasas de oxidación de $[1-^{14}\text{C}]$ - y $[6-^{14}\text{C}]$ -glucosa, que refleja la tasa de oxidación de la glucosa vía PPP, se multiplicó por 1,4 en los astrocitos mCAT (**Figura 10a**, panel derecho). Estos datos sugieren que los niveles de mROS endógenos en los astrocitos reprimen la actividad de la PPP.

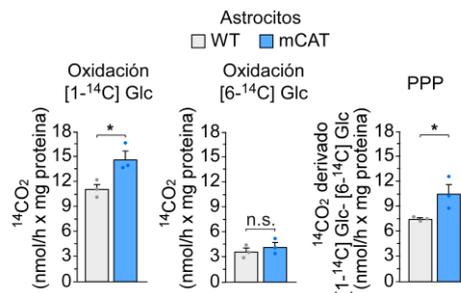


Figura 10. La disminución de mROS endógenos en astrocitos mCAT promueve el consumo de glucosa por la vía de las pentosas fosfato (PPP). (a) Las tasas de producción de $^{14}\text{CO}_2$ derivadas del consumo de $[1-^{14}\text{C}]$ -glucosa (panel izquierdo) y $[6-^{14}\text{C}]$ -glucosa (panel central) en astrocitos WT y mCAT, por parte de astrocitos intactos incubados con la glucosa radiomarcada, se utilizaron para calcular el flujo de oxidación de la glucosa por la vía PPP. La diferencia entre las tasas de producción de $^{14}\text{CO}_2$ de $[1-^{14}\text{C}]$ - y $[6-^{14}\text{C}]$ - glucosa (panel derecho), reveló un incremento del 40% la PPP en los astrocitos mCAT. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. * $P < 0,05$ n.s. no significativo ($n=3$; prueba t-Student).

En su conjunto, estos datos indican que los mROS endógenos astrocíticos regulan fisiológicamente su metabolismo de la glucosa reprimiendo el PPP y promoviendo la glucólisis.

4.3. Influencia de la señalización redox astrocítica en la colaboración astrocito-neurona.

Una vez demostrada que los mROS endógenos astrocíticos regulan diversos procesos fisiológicos de su homeostasis evaluamos la posible afectación de la colaboración astrocito-neurona. Para ello estudiamos un sistema de co-cultivo entre los astrocitos WT o mCAT con neuronas WT. La **Figura 11a** muestra el diseño experimental de estos ensayos, así como una imagen por inmunohistoquímica de la morfología neuronal al finalizar el co-cultivo con los astrocitos. Dado que las neuronas dependen metabólicamente de los astrocitos para su función normal y supervivencia (Bolaños 2016; Magistretti and Allaman 2015), se investigó a continuación la afectación de la supervivencia neuronal por la disminución de la mROS en los astrocitos. Para ello, una vez descartados los insertos que contienen los astrocitos, se detectó en las neuronas la abundancia del fragmento activo de 17 kDa caspasa 3 (CSP-3), efector de

apoptosis (Elmore 2007) en las neuronas. La **Figura 11b** muestra que las neuronas expresan mayor actividad CSP-3 cuando se co-cultivan con astrocitos mCAT que cuando se cultivan con los astrocitos WT. Este resultado se confirmó por la medida de la actividad de CSP-3 en neuronas (**Figura 11c**). Estos resultados sugieren que los mROS de los astrocitos contribuyen a mantener el soporte metabólico y la protección antioxidante de las neuronas colindantes.

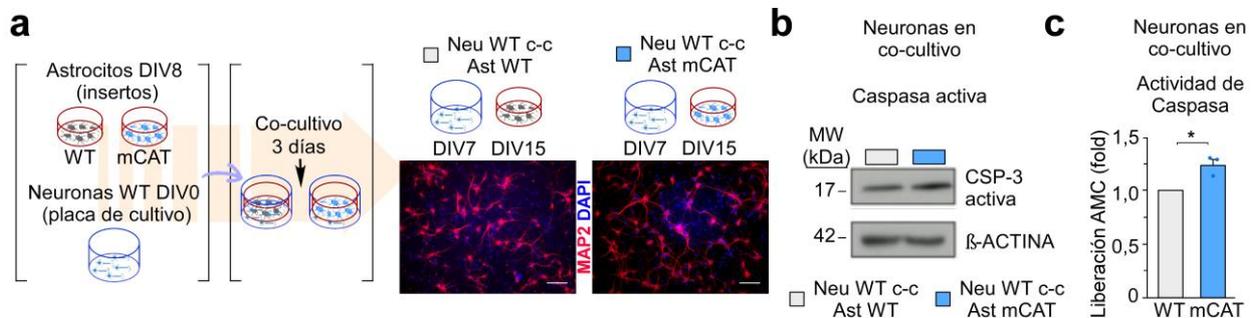


Figura 11. La disminución de mROS endógenos en astrocitos mCAT promueve la muerte de las neuronas en co-cultivo. (a) Representación esquemática del protocolo de co-cultivo (c-c) de astrocitos WT y mCAT con neuronas (Neu) en cultivo primario de animales C57BL/6J *wild type* (WT), junto con una imagen de microscopía de la estructura neuronal (proteína asociada a microtúbulos 2, MAP2) al final del experimento para mostrar que no se aprecian cambios estructurales significativos. DIV: Días *in vitro*. (b) La inmunodetección mediante transferencia tipo *western blot* mostró que, en condiciones basales, el co-cultivo de neuronas con astrocitos mCAT aumenta la abundancia del fragmento activo de la proteína pro-apoptótica caspasa-3 (CSP-3). Se utilizó β -Actina como control de carga. (c) La incubación de neuronas con astrocitos mCAT durante cuatro días muestra una activación de CSP-3 $\sim 0,5$ veces mayor, en condiciones basales, en comparación con las neuronas co-cultivadas con astrocitos WT. La actividad de la caspasa se evaluó *in vitro* mediante la detección fluorescente de 7-amino-4-methylcoumarin (AMC), cuya liberación depende de la acción hidrolítica de la caspasa sobre el péptido sustrato utilizado en la determinación. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. tras normalizar a 1 los valores de las muestras WT * $P < 0,05$ (n=3; prueba t-Student).

5. Estrategia mitoCatalasa *in vivo*: El modelo mCAT condicional permite un control espacio-temporal de la reducción de los niveles endógenos de mROS *in vivo*.

La disminución de mROS astrocíticos mediante el sistema mCAT ha demostrado que éstos pueden ejercer un papel fisiológico modulando aspectos celulares e intercelulares. A continuación, estudiamos las consecuencias *in vivo* de mCAT en las principales células del cerebro. Para ello, generamos y expandimos dos tipos de colonias a partir de cruces de ratones mCAT condicionales ($mCat^{LoxP/+}$) con ratones que expresan el gen de la Cre recombinasa bajo los promotores de *GFAP* (del inglés, *Glial fibrillary acidic protein*) y *CamKIIa* (del inglés, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II Alpha*), con objeto de expresar mCAT en astrocitos o neuronas, respectivamente. Por ello, denominamos a estas dos nuevas líneas GFAP-mCAT y CamK-mCAT (**Figura 12**). Para generar la línea de ratones GFAP-mCAT realizamos cruces con animales GFAP-Cre^{ERT2} (Hirrlinger et al. 2006), generando un modelo inducible que requiere la administración de tamoxifeno para la activación de la proteína CRE en los astrocitos (ver *materiales y métodos*). Por su parte, la activación de la CRE recombinasa en la línea de ratones CamK-mCAT, generada a partir de cruces con animales CamK-Cre (B6N.Cg-Tg(Camk2a-cre)T29-1Stl/J, Jackson Laboratory), ocurre de manera endógena y su patrón de expresión ha sido previamente caracterizado. Ambos modelos de ratón han sido objeto de estudio de este trabajo de tesis, e incluidos en esta memoria, aunque el esfuerzo

principal se dedicó al modelo GFAP-mCAT con objeto de esclarecer el papel fisiológico de los altos niveles de ROS astrocíticos (Lopez-Fabuel et al. 2016).

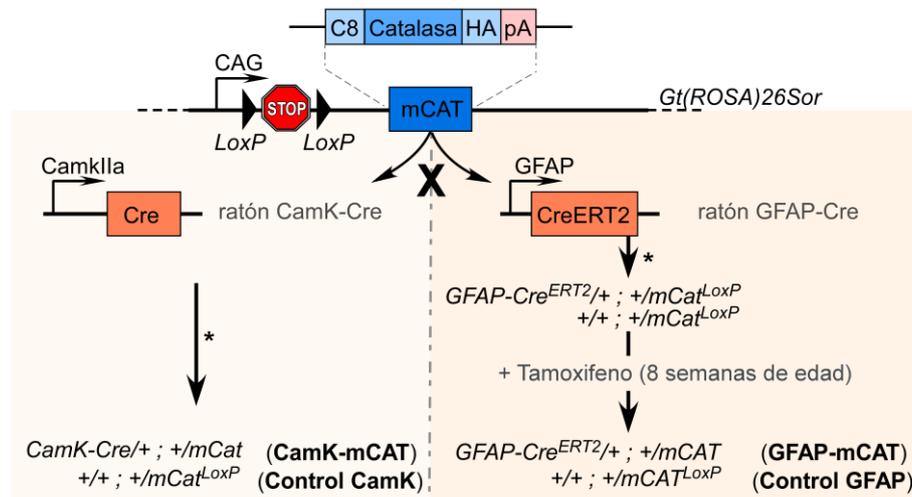


Figura 12. Generación de los modelos mCAT condicionales para la reducción de mROS en astrocitos (GFAP-mCAT) y neuronas (CamK-mCAT). Representación esquemática de la estrategia de los cruces para expresar mCAT en tipos celulares específicos utilizando los ratones mCAT condicionales ($mCat^{LoxP}$). A la izquierda, para la expresión de mCAT en neuronas se utilizaron animales CamK-Cre en los que la expresión de Cre es neuronal y constitutiva. A la derecha, para la expresión de mCAT en astrocitos se utilizaron animales GFAP-Cre^{ERT2}, en los que la expresión de Cre es astrocítica e inducible. La Cre^{ERT2} del modelo GFAP-mCAT es dependiente de tamoxifeno para su activación. Los animales de la línea GFAP-mCAT recibieron durante 5 días consecutivos una inyección intraperitoneal de tamoxifeno (2 mg/25 g de peso del ratón) para activar mCAT en astrocitos. C8, secuencia de procesamiento mitocondrial de citocromo c oxidasa subunidad VIII-; HA, fragmento de la hemaglutinina humana; CAG, promotor ubicuo de CAG (del inglés, *chicken-actin promoter/CMV enhancer*); STOP, señal transcripcional de STOP; pA, señal hGH polyA que promueve tanto la poliadenilación como la terminación; LoxP, sitios de reconocimiento de la enzima Cre recombinasa; CamK, del inglés, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II Alpha*; GFAP; del inglés, *Glial fibrillary acidic protein*; Cre^{ERT2}, Cre recombinasa dependiente del receptor de estrógeno T2 (tamoxifeno). *Las combinaciones de genotipos en la descendencia de estos cruces son cuatro dados los dos alelos a analizar ($mCat$ y Cre). Sin embargo, este esquema representa únicamente los genotipos con los que se ha realizado este estudio, en el que se han descartado aquellos animales que carecen del alelo $mCat$.

5.1. El modelo GFAP-mCAT expresa mCAT exclusivamente en cerebro y específicamente en el compartimento astrocítico.

En primer lugar, se comprobó la idoneidad del tratamiento de tamoxifeno elegido para activar la CRE recombinasa en los genotipos $GFAP^{CreERT2}/+; mCat/+$ y $+/+; mCat/+$ (en adelante GFAP-mCAT y Control, respectivamente). Para ello, se comprobó mediante PCR en muestras de cerebro adulto la eficacia en la eliminación del *cassette* de STOP transcripcional en la construcción mCAT floxeada. Así, se amplificó un fragmento de ADN de menor tamaño exclusivamente en los animales GFAP-mCAT y no en los Control, similar a la observada en el modelo constitutivo mCAT que carecen de este *cassette* (Figura 13a). De acuerdo con estos resultados, la baja proporción de la banda de menor tamaño indica que la activación del evento de recombinación ocurre en una fracción de la población total, correspondiente a astrocitos. Además, se comprobó en animales GFAP-mCAT que el evento de recombinación tiene lugar únicamente en el cerebro (Figura 13b panel izquierdo, donde se muestra la aparición de la banda mCAT en distintas áreas del cerebro) y no en tejidos periféricos (Figura 13b, panel derecho).

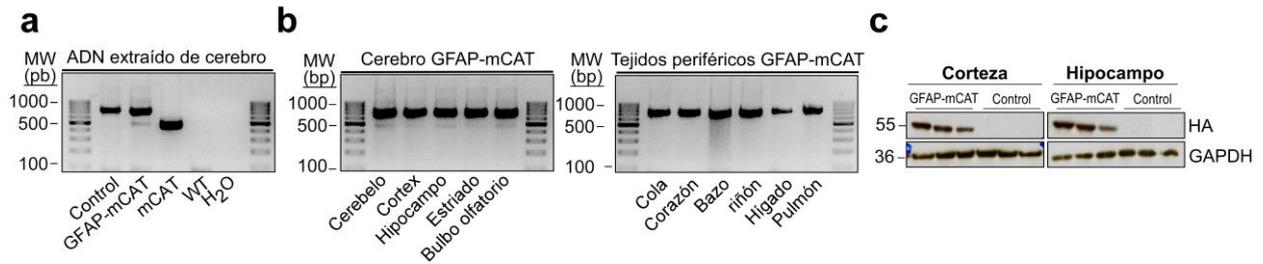


Figura 13. Caracterización del evento de recombinación en los ratones GFAP-mCAT. (a) Análisis del alelo *mCat* mediante PCR en muestras de cerebro de los ratones Control (mCat floxeado sin Cre) GFAP-mCAT (mCat floxeado con Cre únicamente en astrocitos), mCAT (mCat recombinado en todo el cerebro, modelo constitutivo) y WT (sin mCat). Las bandas de 729 pb identifican la construcción *mCat* no recombinada (floxeada) y la de 474 pb corresponde a la recombinada (tras la acción de la Cre). Los animales mCAT constitutivos (474 pb) y *wild type* WT (sin banda) se utilizaron como controles positivos y negativos de la PCR, respectivamente. (b) Resultados de la PCR que muestran la bandas correspondientes a la amplificación del alelo mCAT recombinado (474 pb) en diferentes áreas cerebrales del ratón GFAP-mCAT (panel izquierdo) pero no en tejidos periféricos (panel derecho). (c) Inmunodetección mediante transferencia tipo *western blot* de la expresión de HA, que identifica la proteína mCAT, en distintas áreas del cerebro de animales GFAP-mCAT y no en los animales Control.

El hecho anteriormente resaltado, de que tan sólo un porcentaje de células cerebrales son mCAT positivas, a nuestro juicio, es el motivo por el que no hemos sido capaces de demostrar el patrón de expresión de las células mCAT en el tejido cerebral mediante inmunohistoquímica. Destacamos este hecho conscientes de que hubiera sido de gran utilidad para inferir las regiones cerebrales más afectadas. Sin embargo, los intentos para detectar la proteína mCAT (mediante catalasa o el *tag* HA) en secciones de cerebro no fueron concluyentes. No obstante, sí fue posible la detección de HA mediante inmunotransferencia tipo *western blot* en extractos celulares de distintas áreas cerebrales (Figura 13c). A continuación, para demostrar que esta detección de HA corresponde a la expresión de mCAT exclusivamente en astrocitos, recurrimos a un aislamiento de células de cerebro adulto mediante un método inmuno-magnético basado en el reconocimiento de un marcador específico de astrocitos (ACSA-2) (Figura 14a). Los resultados de la Figura 14b prueban que sólo la fracción positiva correspondiente a astrocitos aislada de cerebros de ratones adultos GFAP-mCAT (14 meses), expresan mCAT a juzgar por la detección de HA y su co-localización (Figura 14c) con la mitocondria mediante inmunotransferencia e inmunohistoquímica, respectivamente.

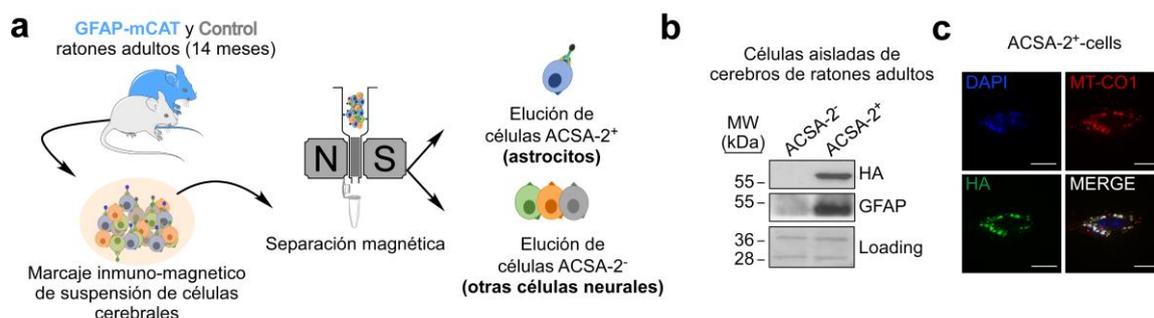


Figura 14. Caracterización de la expresión de mCAT en astrocitos aislados de los ratones GFAP-mCAT adultos. (a) Representación esquemática del enfoque inmunomagnético utilizado para separar los astrocitos (células ACSA-2⁺) de otras células neurales (ACSA-2⁻) del cerebro de ratones adultos GFAP-mCAT

o de control. **(b)** Análisis *ex vivo* mediante inmunotransferencia tipo *western blot* de las células ACSA-2⁺ (astrocitos): confirmación de la expresión específica del marcador astrocítico GFAP y detección de mCAT (mediante la detección de HA) exclusivamente en esta fracción celular. **(c)** Imagen de inmunocitoquímica de células ACSA-2⁺ procedentes de animales GFAP-mCAT que muestran la co-localización del *tag* HA con marcadores mitocondriales (mt-CO1, Citocromo C Oxidasa codificado mitocondrialmente). Barras de escala, 18 μ m (n=2 ratones).

5.2. El modelo GFAP-mCAT reduce eficientemente los niveles de mROS en el compartimento astrocítico.

Una vez demostrada la expresión de mCAT específicamente en astrocitos *in vivo*, se emplearon dos estrategias diferentes para demostrar la eficiencia de mCAT. En primer lugar, siguiendo la estrategia inmuno-magnética mencionada en el apartado anterior, se evaluó la cinética de producción de H₂O₂ mediante la sonda Amplex® Red. La **Figura 15a** muestra que los astrocitos ACSA-2⁺ aislados de cerebros de animales GFAP-mCAT producen un 20% menos H₂O₂ que la misma fracción correspondiente a los animales Control.

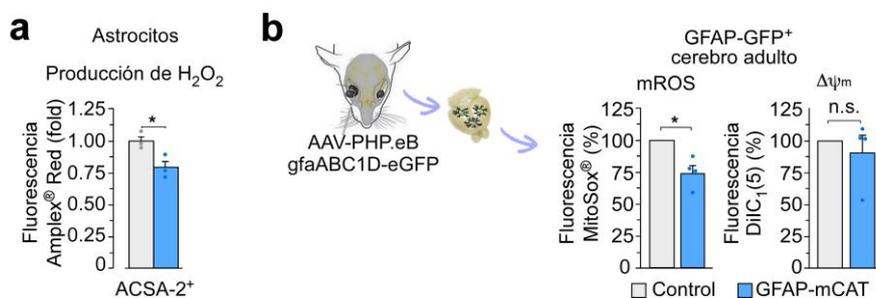


Figura 15. La expresión mitocondrial de la proteína mCAT reduce los niveles endógenos de mROS en astrocitos *in vivo*. **(a)** Análisis *ex vivo* de la producción de H₂O₂ en las células ACSA-2⁺ aisladas de forma aguda en ratones adultos GFAP-mCAT y Control. Datos absolutos en células control ACSA-2⁺, 1.7 pmol h⁻¹ μ g proteína⁻¹. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. tras normalizar a 1 los valores de las muestras Control *P<0,05 (n=3; prueba t-Student). **(b)** Ratones adultos GFAP-mCAT y Control (12 meses) fueron inyectados por vía intravenosa, a través del seno retro-orbital, con una suspensión de virus adeno-asociados (AAVs) que expresan GFP bajo el control del promotor corto de GFAP (AAV-PHP.eB-gfa-ABC1D-eGFP). Tres semanas post-inyección se analizaron las células disociadas agudamente de los cerebros de estos animales. El análisis mediante citometría de flujo detectó una reducción de los niveles de mROS (MitoSox®) en los astrocitos (seleccionados como eventos GFP⁺) de los animales GFAP-mCAT, mientras que el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) permaneció inalterado. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. tras normalizar a 100 los valores de las muestras Control *P<0,05 n.s., no significativo (n=4; prueba t-Student).

Paralelamente, con objeto de confirmar de la eficacia del sistema mCAT, evaluamos *ex vivo* los niveles del anión superóxido (O₂⁻) en los astrocitos de animales adultos. Para seleccionar específicamente los astrocitos de los animales Control y GFAP-mCAT, se inyectó intravenosamente, a través del seno retro-orbital, una suspensión de virus adeno-asociados (AAV) que expresan, bajo el promotor astrocítico *GFAP*, la proteína verde fluorescente (AAVs-GFAP-GFP) (esquema **Figura 15b**). Posteriormente, los niveles de O₂⁻ se evaluaron con la sonda MitoSOX™ mediante citometría de flujo en la suspensión total de células cerebrales tres semanas después de la infección con AAVs, para permitir la expresión de la proteína GFP y evitar la interferencia de cualquier respuesta inmune aguda. Mediante este método se detectó una disminución del 25% en los niveles de mROS en la fracción GFP⁺ (GFAP-GFP, correspondiente a astrocitos)

de los animales GFAP-mCAT (**Figura 15b**), mientras que no se detectaron diferencias en la fracción GFP- (datos no mostrados). Se estudió paralelamente el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), en las mismas condiciones como control del acceso de la sonda MitoSOX™, sin observarse diferencias en la población astrocítica (**Figura 15b**, panel derecho).

6. Influencia *in vivo* de la señalización redox astrocítica en el programa de expresión génica de astrocitos y neuronas.

Dada a la estrecha colaboración entre astrocitos y neuronas pensamos que sería interesante estudiar la respuesta neuronal a la disminución de mROS en los astrocitos. No obstante, estudiar si este tipo de respuestas tienen lugar *in vivo* en el cerebro adulto supone un gran salto técnico. La complejidad es mucho mayor si además centramos el estudio en un único tipo celular dentro del entramado cerebral. Para poder estudiar los fenómenos que tienen lugar *in vivo* en el cerebro adulto recurrimos a una aproximación *ex vivo*. Las **Figuras 14a y 16a** esquematizan el método de purificación de células neurales de adulto puesto a punto para este trabajo y que combina protocolos manuales de disgregación tisular acoplados al uso de kits comerciales basados en separación inmuno-magnética para aislar astrocitos y neuronas de adulto, respectivamente. La mielinización de los cerebros de animales adultos representa un problema técnico que repercute, sobre todo, en el rendimiento del aislamiento. Una vez confirmado el rendimiento e integridad del del ARN total (ver *Materiales y métodos*) obtenido del aislamiento de estas poblaciones de astrocitos y neuronas, en animales adultos (14 meses) de los genotipos Control y GFAP-mCAT realizamos un análisis comparado del transcriptoma completo de ambas poblaciones celulares, mediante microarrays de expresión de Affymetrix.

6.1. Modulación mROS astrocíticos en la expresión de genes neuronales

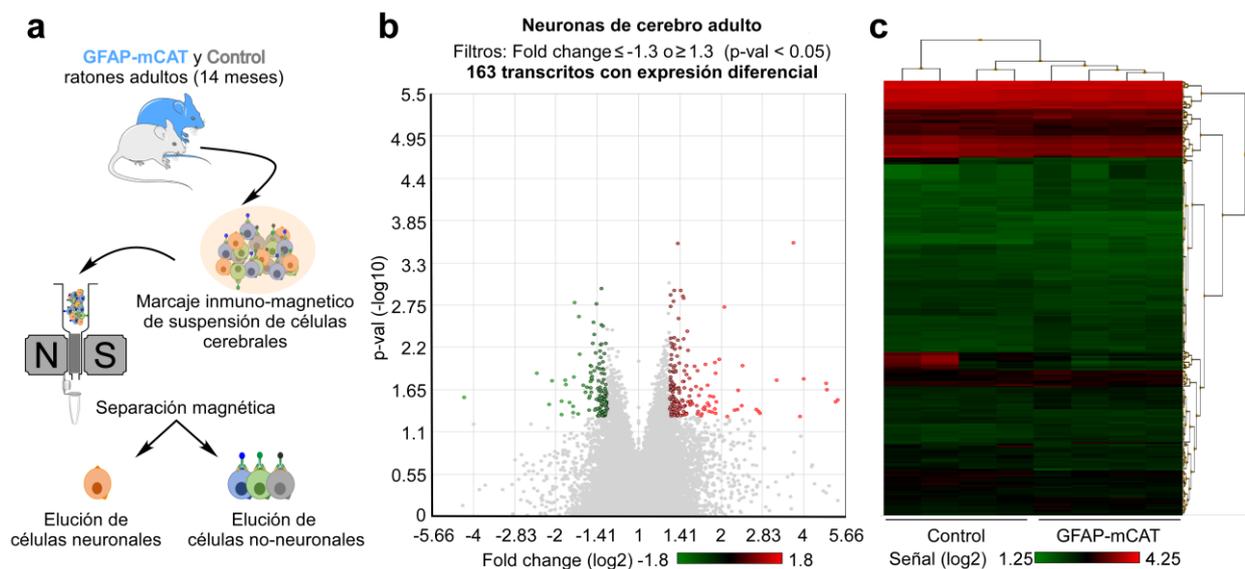


Figura 16. La reducción de los mROS astrocíticos *in vivo* no afecta significativamente el patrón de expresión génica en las neuronas colindantes. **(a)** Representación esquemática del enfoque inmunomagnético utilizado para separar las neuronas de otras células neurales del cerebro de ratones adultos GFAP-mCAT o de control, mediante el marcaje inmunomagnético de células no-neuronales y elución de neuronas intactas (purificación por exclusión). **(b)** *Volcano plot* que representa las diferencias de los niveles de expresión (*fold change*, eje X) y valor estadístico (*P-valor*, eje Y) del transcriptoma completo de las muestras de neuronas de ratones adultos Control o GFAP-mCAT. Se resaltan coloreados los transcritos para

los que se encontraron una expresión diferencial estadísticamente significativa, verde o rojo, infra- o sobre-expresados, respectivamente. **(c)** Dendrograma y mapa de calor con los 163 transcritos (en filas) con expresión diferencial estadísticamente significativa entre los genotipos analizados (en columnas). La escala de color representa en este caso los niveles de expresión, la predominancia del color verde indica la baja expresión de los transcritos encontrados con una expresión diferencial.

Microarrays Affymetrix MTA-1_0; Análisis mediante software *Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0*; método Gene + Exon - SST-RMA (n=4 animales por genotipo).

En análisis transcriptómico comparado de las neuronas procedentes de ambos genotipos, identifiqué un pequeño número de genes con una expresión diferencial estadísticamente significativa: 163 transcritos, representados en el *volcano plot* de la **Figura 16b** que representa el grado de las diferencias (en *fold change*, es decir, nº de veces) y su valor estadístico. Del esquema jerárquico con mapa de calor de la **Figura 16c** podemos extraer dos conclusiones; 1) No se aprecian grandes diferencias de contraste entre los valores las neuronas Control y las aisladas de ratones GFAP-mCAT (en columnas) en los 163 transcritos (en filas), lo que sugiere que a pesar de existir diferencias significativas en este grupo de genes éstas no son muy grandes y 2) de acuerdo con la escala del mapa de color que se refiere a los niveles de expresión de los genes filtrados se observa una preferencia del color verde que indica que las diferencias encontradas se encuentran en genes poco expresados. La relevancia de un gen no es directamente proporcional a sus niveles de expresión, pero dado el bajo contraste entre condiciones y que en muchos casos los niveles de expresión de los genes encontrados son similares a los de genes no expresados en tejido cerebral el análisis finalizó en este punto.

6.2. Modulación mROS astrocíticos en la expresión de genes astrocíticos.

Paralelamente, se investigó si la reducción de los ROS mitocondriales en astrocitos adultos alteraba su perfil transcripcional *in vivo*. En este caso, encontramos más de 600 transcritos utilizando los mismos filtros de diferencias y significatividad estadística que en el análisis comparado de las neuronas. En este caso el *volcano plot* de la **Figura 17a**, además de representar un mayor número de puntos coloreados correspondientes a los diferentes transcritos filtrados, observamos una mayor dispersión en el eje de ordenadas que representa la significatividad de las diferencias observadas. Esta representación también nos muestra que los transcritos infra-expresados y sobre-expresados correspondientes a las nubes de puntos a izquierda y derecha del centro del eje de abscisas del gráfico, respectivamente, es similar (sobre-expresados: 357 [55,52%]; infra-expresados: 286 [44,48%]). Sin embargo, la dispersión a lo largo del eje de abscisas, aunque mayor que lo analizado anteriormente para el estudio de las neuronas, no es muy grande, pero suficiente como para apreciar esta vez un mayor contraste entre los grupos a comparar (en columnas, astrocitos aislados de animales Control y GFAP-mCAT) en el esquema jerárquico con mapa de calor de la **Figura 17b**. Así, los 643 transcritos representados en filas muestran una mayor gama de color en la escala que representa los niveles de expresión, predominando en este caso el rojo, lo que indica que las diferencias encontradas ocurren en genes con una mayor expresión. Esto tiene a nuestro juicio más relevancia funcional con respecto a las diferencias encontradas en el análisis neuronal.

Entre los genes filtrados, identificamos diferencias de expresión en genes involucrados en el metabolismo glucídico, tales como la ruta de las pentosas fosfato (PPP) y glucólisis, así como de las distintas subunidades de la cadena de transporte de electrones. No obstante, a pesar de la sintonía de algunos de estos genes con los resultados *in vitro*, generalmente eran cambios individuales, pequeños y, a menudo, sus diferencias no superaban los filtros estadísticos impuestos. Un escrutinio de esta tipo nos

limitaría a estudiar los cambios esperados según resultados previos. Además, se requeriría una confirmación previa mediante qPCR primero *ex vivo* y posteriormente, verificar su reproducibilidad en sistemas *in vitro* con y/o sin la influencia de neuronas u otros tipos celulares.

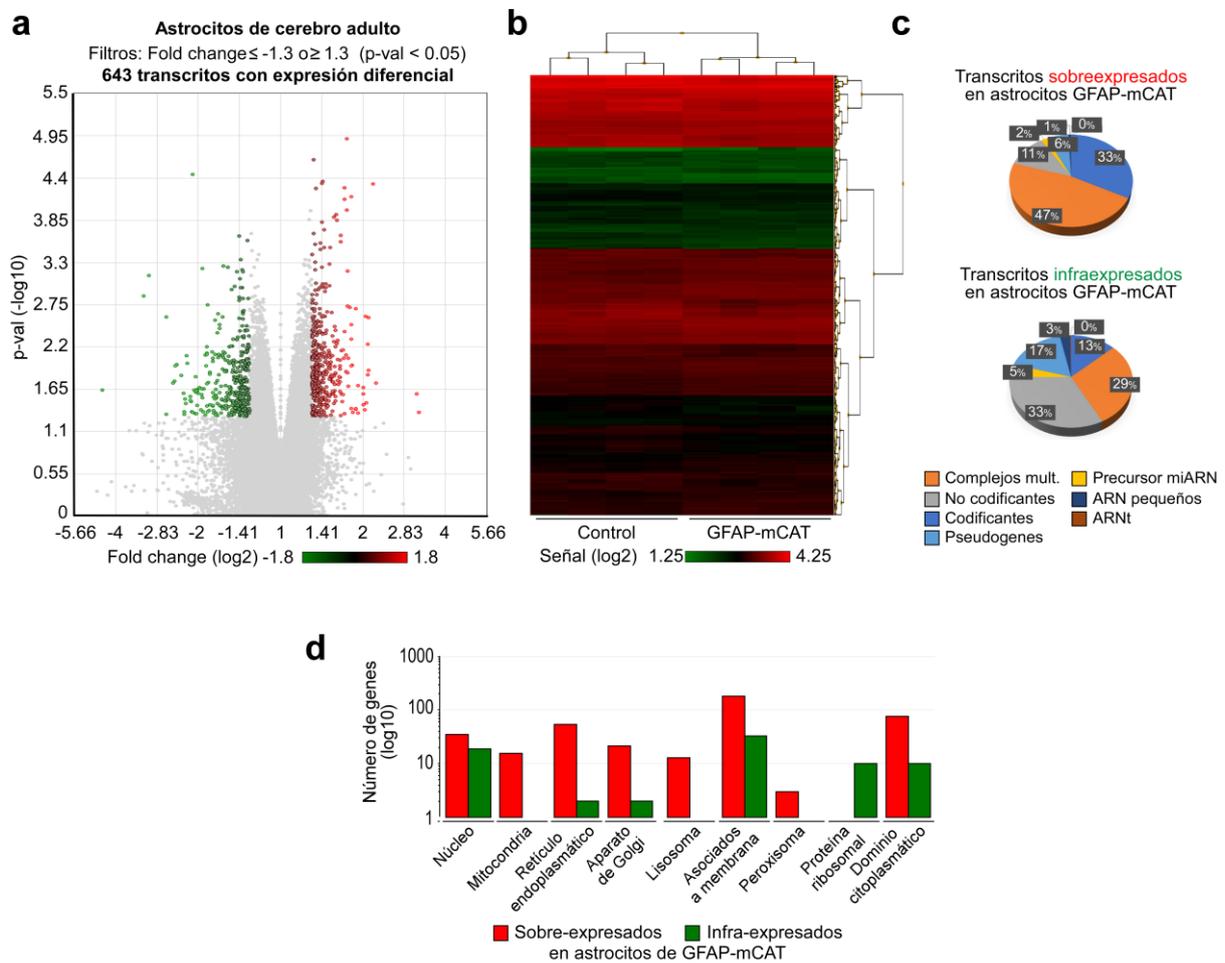


Figura 17. La reducción de los mROS astrocíticos *in vivo* altera el patrón de expresión génica de los astrocitos. (a) *Volcano plot* que representa las diferencias de los niveles de expresión (*fold change*, eje X) y valor estadístico (*P-valor*, eje Y) del transcriptoma completo de las muestras de astrocitos de ratones adultos Control o GFAP-mCAT. Se resaltan coloreados los transcritos para los que se encontraron una expresión diferencial estadísticamente significativa, verde o rojo, infra- o sobre-expresados, respectivamente. (b) Dendrograma y mapa de calor con los 643 transcritos (en filas) con expresión diferencial estadísticamente significativa entre los genotipos analizados (en columnas). Entre los genes filtrados encontramos diversos niveles de expresión de acuerdo con la escala de color. (c) Diagramas de pastel de los transcritos infra- o sobre-expresados, según la clasificación del tipo de transcritos. (d) Clasificación de los 643 transcritos filtrados en el análisis según su anotación en el grupo ontológico de componente celular (Escala logarítmica).

Microarrays Affymetrix MTA-1_0; Análisis mediante software *Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0*; método Gene + Exon - SST-RMA ($n=4$ animales por genotipo).

Para poder explorar nuevos resultados, realizamos un estudio no dirigido y restrictivo con el conjunto de transcritos filtrados según los sus diferencias en *fold change* y significatividad estadística (definidos en la **Figura 17a**). Así, la **Figura 17c** recoge las características generales de los 643 transcritos filtrados y los tipos de transcritos que encontramos entre los genes infra/sobre-expresados tras la reducción de mROS astrocíticos. En el gráfico superior de la **Figura 17c**, correspondiente a transcritos sobre-expresados,

destacan los genes que forman parte de complejos multiproteicos (multigénicos). Sin embargo, al estudiar este subgrupo en detalle encontramos que solo unos pocos genes forman parte de los mismos complejos. De este resultado podemos inferir que dentro de los complejos multiproteicos existen subunidades más sensibles a la acción señalizadora de los mROS. Por su parte, en el gráfico inferior de la **Figura 17c**, destaca un alto porcentaje de transcritos no codificantes entre los transcritos infra-expresados. Esto reduce sustancialmente la posibilidad de estudiar los procesos celulares que se ven afectados, y favorece una tendencia de la señalización redox a la sobreexpresión. Por último, la **Figura 17d** muestra que los transcritos implicados forman parte de procesos relacionados con los distintos orgánulos celulares, lo que sugiere la complejidad e influencia de la señalización redox.

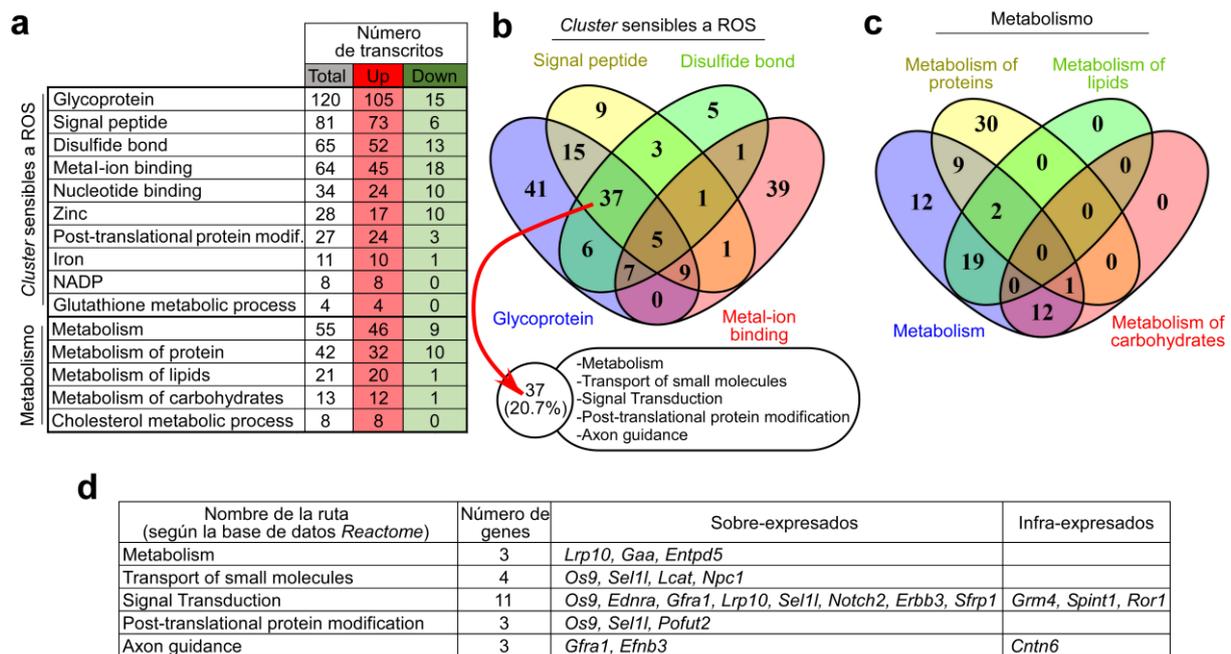


Figura 18. La reducción de los mROS astrocíticos *in vivo* altera la transcripción de rutas metabólicas y dianas de señalización por ROS en astrocitos. (a) Tabla resumen con los principales grupos funcionales, extraídos del análisis de anotación funcional y enriquecimiento ontológico de los 643 transcritos con expresión diferencial estadísticamente significativa detectados en los astrocitos de ratones adultos GFAP-mCAT y Control. El análisis se realizó con las herramientas Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) e Integrated Molecular Pathway Level Analysis (IMPALA). Up o Down se refiere a la sobre- o infra-expresión en el genotipo GFAP-mCAT *versus* el genotipo de Control. **(b)** El diagrama de Venn del grupo de transcritos denominados como “sensibles a ROS” mostró un conjunto de 37 transcritos (**Tabla 1**) con el término común péptido de señal, enlace de disulfuro y glicoproteína. Su análisis mediante IMPALA reveló la implicación funcional de algunos de éstos (mostrados en **d**) **(c)** Diagrama de Venn del grupo de metabolismo muestran una alteración del metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos, en el caso de los transcritos clasificados en el “metabolismo de proteínas” puso en evidencia que la mayoría de los transcritos (30/42) no están directamente relacionados con procesos metabólicos, y se incluyen en este grupo por su función en procesos post-traduccionales, por ejemplo, entre otros. **(d)** Continuación del análisis (b) se indican de acuerdo con la nomenclatura de referencia *RefSeq* y su categoría funcional según *Reactome*. *Ya que los grupos funcionales en las bases de datos pueden variar ligeramente, se han mantenido los nombres originales en inglés para su correcta búsqueda.

Con objeto de obtener un agrupamiento funcional de los procesos celulares modulados por los mROS astrocíticos, se realizó un análisis de enriquecimiento ontológico con los 643 transcritos previamente filtrados. Para ello, mediante la herramienta bioinformática DAVID v6.8 (del inglés, *Database for*

Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Huang, Brad T Sherman, et al. 2009; Huang, Brad T. Sherman, et al. 2009) encontramos anotación funcional para un total de 580 transcritos con distintas anotaciones en la categorías ontológicas de función molecular, componente celular y/o proceso biológico. Dado el alto número de transcritos evaluados, la respuesta de este análisis bioinformático resultó compleja. La tabla de la **Figura 18a** incluye una selección con las categorías funcionales más interesantes según el número de genes implicados, su posible relación directa con la señalización redox o por su relación con el metabolismo celular. Destacan el gran número de transcritos que anotan en categorías funcionales de acuerdo con las “keywords” anotadas en la base de datos de Uniprot, como “glycoprotein”, “disulfide bond” y “signal”, términos que no se han traducido para facilitar su búsqueda correctamente en las bases de datos. La mayoría de estos genes se encuentran **sobre-expresados** (Glycoprotein 120 genes; **105:15**, Disulfide bond 65 genes; **52:13**, signal 81 genes; **75:6**, Metal-binding (65 genes; **45:18**).

Gen	Nombre oficial (RefSeq)	Nº de acceso (NCBI)	Cromosoma en ratón	Sentido banda	Tipo de transcrito
<i>Bmp7</i>	bone morphogenetic protein 7	NM_007557	Cr2	-	Complejos multigénicos
<i>Cd59a</i>	CD59a antigen	NM_001111060	Cr2	+	Complejos multigénicos
<i>Cntfr</i>	ciliary neurotrophic factor receptor	NM_001136056	Cr4	-	Complejos multigénicos
<i>Cntn6</i>	contactin 6	NM_017383	Cr6	+	Complejos multigénicos
<i>Cntnap4</i>	contactin associated protein-like 4	NM_130457	Cr8	+	Complejos multigénicos
<i>Creld2</i>	cysteine-rich with EGF-like domains 2	NM_029720	Cr15	+	Codificante
<i>Dkk3</i>	dickkopf homolog 3 (<i>Xenopus laevis</i>)	NM_015814	Cr7	-	Codificante
<i>Ednra</i>	endothelin receptor type A	NM_010332	Cr8	-	Complejos multigénicos
<i>Efnb3</i>	ephrin B3	NM_007911	Cr11	-	Codificante
<i>Egfl6</i>	EGF-like-domain, multiple 6	NM_019397	CrX	-	Codificante
<i>Entpd5</i>	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5; , transcript variant 1,	NM_001026214	Cr12	-	Complejos multigénicos
<i>ErbB3</i>	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	NM_010153	Cr10	-	Codificante
<i>Gaa</i>	glucosidase, alpha, acid	NM_001159324	Cr11	+	Complejos multigénicos
<i>Gfra1</i>	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1	NM_001285457	Cr19	-	Complejos multigénicos
<i>Grm4</i>	glutamate receptor, metabotropic 4	NM_001013385	Cr17	-	Complejos multigénicos
<i>IgSF1</i>	immunoglobulin superfamily, member 1	NM_177591	CrX	-	Complejos multigénicos
<i>IgSF11</i>	immunoglobulin superfamily, member 11	NM_170599	Cr16	+	Codificante
<i>Lcat</i>	lecithin cholesterol acyltransferase	NM_008490	Cr8	-	Codificante
<i>Lgals3bp</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	NM_011150	Cr11	-	Complejos multigénicos
<i>Lrp4</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 4	NM_001145857	Cr2	+	Complejos multigénicos
<i>Lrp10</i>	low-density lipoprotein receptor-related protein 10	NM_022993	Cr14	+	Codificante
<i>Megf10</i>	multiple EGF-like-domains 10	NM_001001979	Cr18	+	Complejos multigénicos
<i>Mog</i>	myelin oligodendrocyte glycoprotein	NM_010814	Cr17	-	Complejos multigénicos
<i>Nagpa</i>	N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase	NM_013796	Cr16	-	Complejos multigénicos
<i>Nlgn3</i>	neuroligin 3	NM_172932	CrX	+	Complejos multigénicos
<i>Notch2</i>	Mus musculus notch 2 (Notch2)	NM_010928	Cr3	+	Complejos multigénicos
<i>Npc1</i>	Niemann-Pick type C1; Niemann Pick type C1	NM_008720	Cr18	-	Complejos multigénicos
<i>Os9</i>	amplified in osteosarcoma	NM_001171026	Cr10	-	Complejos multigénicos
<i>Pofut2</i>	protein O-fucosyltransferase 2	NM_030262	Cr10	+	Codificante
<i>Ror1</i>	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	NM_013845	Cr4	+	Complejos multigénicos
<i>Sel1l</i>	sel-1 suppressor of lin-12-like (<i>C. elegans</i>)	NM_001039089	Cr12	-	Complejos multigénicos
<i>Sema4b</i>	sema domain, (semaphorin) 4B	NM_013659	Cr7	+	Complejos multigénicos
<i>Sfrp1</i>	secreted frizzled-related protein 1	NM_013834	Cr8	+	Codificante
<i>Siae</i>	sialic acid acetyltransferase	NM_011734	Cr9	+	Codificante
<i>Spint1</i>	serine protease inhibitor, Kunitz type 1	NM_016907	Cr2	+	Complejos multigénicos
<i>Tmem81</i>	transmembrane protein 81	NM_029025	Cr1	+	Codificante
<i>Tyro3</i>	TYRO3 protein tyrosine kinase 3	NM_019392	Cr2	+	Complejos multigénicos

Tabla 1. 37 transcritos con expresión diferencial en astrocitos, filtrados por sus propiedades comunes de interés en el análisis ontológico.

El diagrama de Venn de la **Figura 18b** muestra que un total de 37 transcritos (**Tabla 1**) comparten 3 de las 4 funciones destacadas. A su vez, el análisis funcional de estos genes (recogidos en la tabla de la **Figura 18d**) muestra que están involucrados, según su anotación en la base de datos Reactome, en procesos como metabolismo, transporte de pequeñas moléculas y modificaciones post-traduccionales,

entre otros procesos. Además, las propiedades por las que han sido previamente filtradas indica la presencia de puentes disulfuro, susceptibles de regulación redox, así como de otras propiedades que podrían sugerir señalización redox en proteínas que requieren modificaciones postraduccionales, como la glucosilación o procesamiento de péptido señal. Por último, un total de 55 genes anotados con funciones de “metabolism” que a su vez puede subdividirse en metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos, como muestra el diagrama de Venn de la **Figura 18c**. Este resultado indica que la señalización redox astrocítica no sólo modula el metabolismo glucídico, sino que sugiere su acción en otros procesos del metabolismo energético.

7. Influencia *in vivo* de la señalización redox astrocítica en el metabolismo cerebral.

Con objeto de determinar si la modulación de la expresión génica mediada por los ROS mitocondriales en los astrocitos altera diversas vías metabólicas, realizamos un estudio metabolómico no dirigido en los extractos cerebrales del GFAP-mCAT y en ratones control. Aunque, el diseño experimental de este estudio debería contemplar las poblaciones de astrocitos y neuronas por separado, esto no fue posible debido al bajo rendimiento de la técnica de purificación. Por ello, el estudio se realizó comparando el perfil metabólico de los cerebros de 7 animales adultos (14 meses de edad) de ambos genotipos Control y GFAP-mCAT. Así, el análisis no supervisado de componentes principales representado en la **Figura 19a** muestra que no hay una separación evidente entre genotipos según la abundancia de los metabolitos detectados. No obstante, este análisis nos permitió detectar la abundancia de 540 metabolitos distintos en un rango amplio de concentraciones.

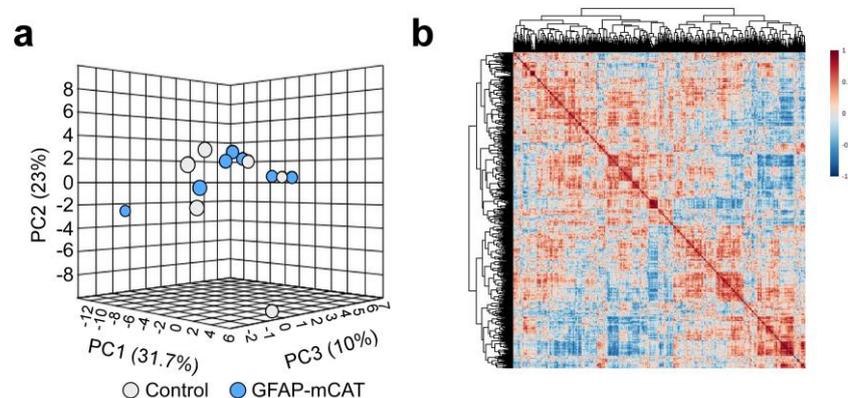


Figura 19. La reducción de los mROS astrocíticos *in vivo* altera el metabolismo cerebral (I). (a) El análisis de los componentes principales (PCA) de los metabolitos cerebrales sugiere que las diferencias encontradas entre el GFAP-mCAT y los grupos de Control ($n = 7$ ratones 14 meses machos por condición) son leves, probablemente porque este estudio de metabolómica se realizó en extractos de todo el cerebro, aunque sólo un tipo de célula neural; los astrocitos, fue alterado genéticamente. (b) Matriz de correlación de los 540 metabolitos detectados. El coeficiente de correlación muestra hasta qué punto los cambios en el valor de una variable están correlacionados con los cambios en el valor de la otra. El (+ o -) indica la dirección de la correlación.

Por otro lado, la matriz de correlación de la **Figura 19b** se utiliza para investigar la dependencia entre múltiples variables al mismo tiempo. Nos indica que existen interacciones entre los 540 metabolitos como se aprecia en los *cluster* formados con colores rojos intensos que indican un alto índice de correlación entre metabolitos. Esto es así, debido a que muchos de los metabolitos forman parte de una

misma ruta metabólica. Aunque no hemos utilizado esta utilidad, este análisis también podría servir para identificar la influencia de unas vías metabólicas sobre otras. Esto es posible si se encuentran interacciones entre metabolitos pertenecientes a vías poco relacionadas que podría sugerir que éstos se encuentran en nodos comunes a varias rutas.

En el *volcano plot* de la **Figura 20a** se representan los 540 metabolitos detectados, según su abundancia y la significatividad estadística de su abundancia relativa, entre cerebros control y GFAP-mCAT. Las regiones coloreadas incluyen aquellos metabolitos con una diferencia estadísticamente significativa. Esto incluye a un total de 53 metabolitos (4 incrementados y 49 reducidos en los cerebros GFAP-mCAT) para un $p\text{-valor} < 0,05$ además de otro grupo de 40 metabolitos (8 incrementados y 32 reducidos en los cerebros GFAP-mCAT) cercanos a este nivel de significatividad ($0,05 < p\text{-valor} < 0,10$), lo que demuestra que la disminución de mROS astrocíticos favorece una reducción de aquellos metabolitos cuya abundancia relativa se ha alterada. Esto se observa en el mapa de calor representado en **Figura 20b**, donde además se representan los valores individuales de los metabolitos filtrados en cada animal analizado, lo que facilita detectar si existe variabilidad constante en alguno de los animales, que no ha sido el caso.

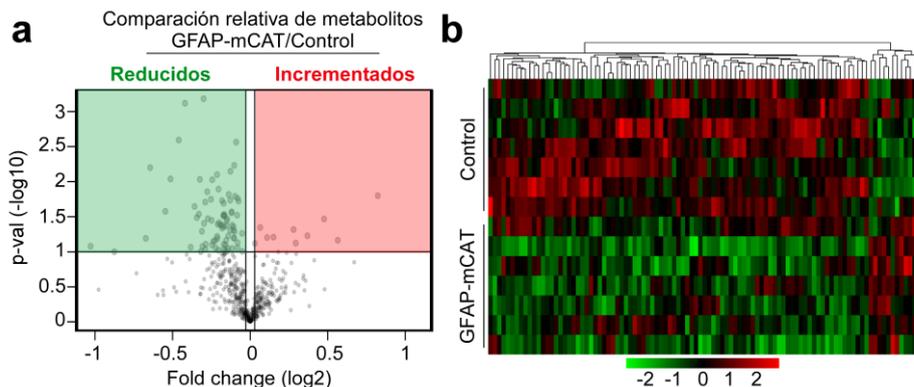


Figura 20. La reducción de los mROS astrocíticos *in vivo* altera el metabolismo cerebral (II). (a) *Volcano plot* que representa las diferencias de los niveles de abundancia (*fold change*, eje X) y valor estadístico (*P-valor*, eje Y). La representación muestra la distribución de los 540 metabolitos detectados en este estudio. Las áreas destacadas incluyen 53 metabolitos (4 aumentados, 49 disminuidos) alterados significativamente ($p < 0,05$) y 40 metabolitos (8 aumentados, 32 disminuidos) que se acercaron a la significación estadística ($0,05 < p < 0,10$) en el cerebro del GFAP-mCAT en comparación con los ratones Control. (b) Dendrograma y mapa de calor de los 100 metabolitos con mayores diferencias estadísticas según prueba t-Student (elaborado con la herramienta online Metaboanalyst según promedio de los valores de abundancia, método euclidiano para la medida de las distancias del dendrograma).

La **Figura 21** ilustra de forma simplificada los metabolitos filtrados hasta un $p\text{-valor} < 0,10$ y su clasificación según su relación con las principales rutas metabólicas; aminoácidos, lípidos, carbohidratos, nucleótidos y cofactores y vitaminas. Esto nos mostró que la señalización redox astrocítica efectivamente es capaz de modular el metabolismo energético no sólo de los propios astrocitos sino de todo el tejido cerebral. Esta regulación podría entenderse de manera directa por algunos ROS como el H_2O_2 cuyos niveles cerebrales tienen origen en el compartimento astrocítico y presenta una alta difusión y funciones demostradas (Sheng et al. 2013; Sies 2014b; Toledano, Planson, and Delaunay-Moisán 2010).

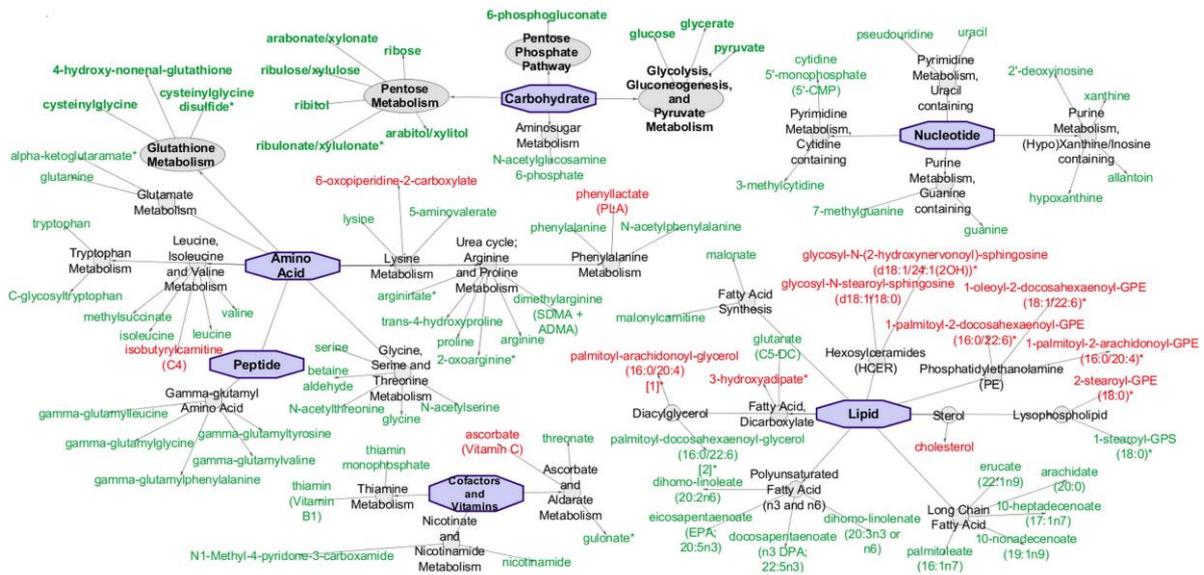


Figura 21. La reducción de los mROS astrocíticos *in vivo* altera múltiples vías del metabolismo cerebral. Esquema de redes simplificado elaborado con la herramienta Cytoscape. Esta representación refleja la complejidad de los cambios metabólicos detectados en el cerebro tras la disminución de mROS astrocíticos en los animales mCAT. La representación solamente incluye los metabolitos con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,10$) que abarcan las vías metabólicas relacionadas con aminoácidos, nucleótidos, lípidos, carbohidratos y cofactores/vitaminas, en consonancia con el análisis transcriptómico llevado a cabo en astrocitos derivados de los animales GFAP-mCAT y Control. Los metabolitos en color verde o rojo denotan disminución o aumento en los ratones GFAP-mCAT, respectivamente. *Se han mantenido los nombres originales en inglés para su correcta búsqueda en las bases de datos de referencia *Human Metabolome Database* (HMDB) y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG).

En consonancia con los resultados elaborados *in vitro*, nos centramos en los cambios identificados en los compuestos del metabolismo de carbohidratos. La **Figura 22a** se destaca la mayor relación ribosa 5-fosfato/6-fosfogluconato y la menor relación piruvato/glucosa, lo que probablemente sugiere un aumento de la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP) y una disminución de la glucólisis, respectivamente. Dada la destacada importancia de la actividad glucolítica astrocítica para el soporte neuronal se realizó un experimento, en colaboración con el Profesor Sebastián Cerdán (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Madrid), para evaluar el metabolismo *in vivo* de la glucosa por parte del cerebro. Para ello, se inyectaron animales control y GFAP-mCAT con un bolo intraperitoneal de $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa. La **Figura 22b** muestra los resultados obtenidos al determinar el extracto cerebral mediante resonancia magnética nuclear (^{13}C -RMN) de los niveles normalizados de $[3-^{13}\text{C}]$ -lactato derivado del consumo *in vivo* de $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa.

El estudio metabólico mostró una reducción de los niveles de fructosa en los animales GFAP-mCAT. Concretamente una bajada del 15% (no estadísticamente significativa), pero de especial relevancia teniendo en cuenta que el análisis transcriptómico identificó un incremento en su transportador específico GLUT5 (codificado por el gen *Slc2a5*, del inglés, *solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 5*) y el gen de la sorbitol deshidrogenasa (*Sord*), enzima clave en la ruta de los polialcoholes que transforma sorbitol en fructosa. Dada la importancia de la fructosa en el metabolismo cerebral I (Chanpimol et al. 2017; Kim et al. 2012; Park et al. 2017; Storz and McClelland 2017; Xu et al. 2016), determinamos los niveles de fructosa *in vivo* en cerebros de animales mCAT constitutivos. La

Figura 22c muestra una disminución significativa en los niveles de fructosa en el cerebro de los animales mCAT. Este resultado abre una nueva vía de investigación que relaciona señalización redox y metabolismo glucídico cerebral.

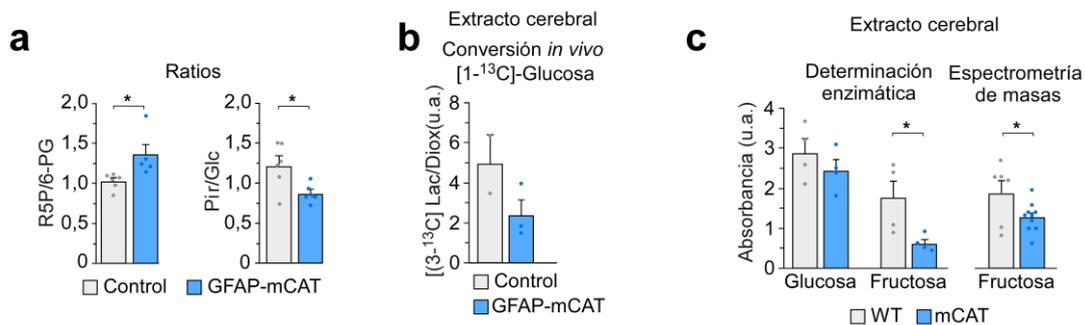


Figura 22. La disminución de mROS *in vivo* en los animales GFAP-mCAT modula diversas vías del metabolismo de la glucosa.

(a) Ratios de la concentración detectada en el análisis metabolómico para la ribosa 5-fosfato (R5P), 6-fosfogluconato (6PG), piruvato (Pir) y glucosa (Glc) en los ratones GFAP-mCAT y Control, indican el incremento de R5P/6PG y disminución del Pir/Glc, lo que probablemente indica un incremento de la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la glucólisis, respectivamente. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. tras normalizar a 1 los valores de los ratones Control * $P < 0,05$ ($n=6$; prueba t-Student). **(b)** La determinación de los niveles de [3-¹³C]-lactato en extracto cerebral, mediante resonancia magnética nuclear (¹³C-RMN), derivado del consumo *in vivo* de [1-¹³C]-glucosa en ratones adultos reveló una reducción de estos niveles compatible con una reducción de la vía glucolítica en los ratones GFAP-mCAT. Se utilizó el patrón interno Dioxano para normalizar los niveles de los metabolitos detectados. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. ($n=2$ y 3 , Control y GFAP-mCAT, respectivamente, aunque cada muestra procede de 2 cerebros del mismo genotipo). **(c)** La determinación enzimática y por espectrometría de masas de fructosa, relacionado con la disponibilidad de glucosa en el cerebro, reveló una disminución de este metabolito en los cerebros mCAT. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. en unidades arbitrarias (u.a.) * $P < 0,05$ ($n=4$ y 10 ; prueba t-Student).

8. Influencia *in vivo* de la señalización redox astrocítica en la histología cerebral.

El estudio de metabolómica reflejó que la modulación de los niveles de mROS en el compartimento astrocítico de los animales GFAP-mCAT, puede originar consecuencias a nivel tisular. Por ello, a continuación, nos propusimos investigar si la disminución de los mROS en los astrocitos alteraba la morfología cerebral. La **Figura 23a** muestra una tinción Nissl de secciones representativas de animales Control y GFAP-mCAT, en las que no se observan alteraciones anatómicas significativas en ninguna estructura cerebral. No obstante, en la **Figura 23b** se compara la reconstrucción de una sección sagital completa de una imagen de inmunofluorescencia con marcajes específicos de marcadores neuronales y astrocíticos. En esta se puede apreciar una mayor diferencia en los marcajes, de lo que se infiere una posible afección neuronal.

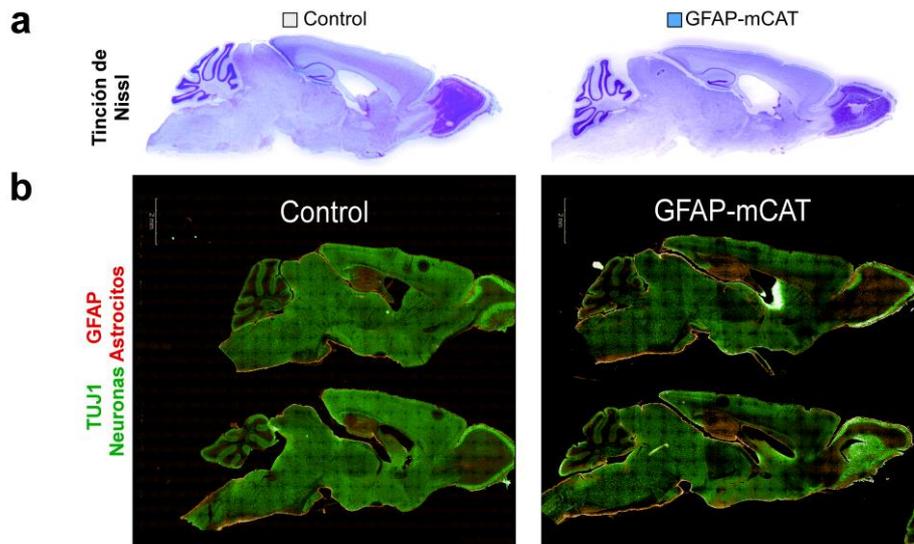


Figura 23. La reducción de los mROS astrocíticos *in vivo* no induce alteraciones anatómicas cerebrales, aunque se aprecian alteraciones celulares. (a) Análisis de secciones sagitales de cerebros de ratones GFAP-mCAT y Control mediante tinción Nissl no reveló alteraciones anatómicas visibles en las principales estructuras cerebrales (n=3 ratones por genotipo). (b) La imagen de la reconstrucción microscópica de cortes sagitales, tras la inmunodetección de proteínas típicas de astrocitos (GFAP, proteína glial fibrilar) y de neuronas (TUJ1, β -tubulina), sugiere una alteración a nivel celular a juzgar por los niveles de marcaje de estas proteínas estructurales en los animales GFAP-mCAT. (n=3 ratones por genotipo).

Posteriormente, se estudió en detalle el hipocampo y la corteza parietal en secciones sagitales de animales control y GFAP-mCAT, dada la relevancia funcional de estas áreas cerebrales por las funciones superiores que coordinan. Las microfotografías y cuantificaciones de las **Figura 24** y **Figura 25** muestran una disminución del marcaje neuronal en los animales GFAP-mCAT a nivel hipocampal y en la corteza parietal, respectivamente. Esta reducción se observó de manera independiente en la señal de dos proteínas específicas neuronales: MAP2 (del inglés, *Microtubule Associated Protein 2*) y TUJ1 (del inglés, según su nomenclatura oficial TUBB3, *Tubulin beta-3 chain*). Estos resultados son compatibles con una pérdida de densidad neuronal o de su estructura dendrítica, comúnmente observado en defectos de disrupción dendrítica, si bien se requerirían estudios específicos de mayor resolución para demostrarlo.

En las **Figura 24** y **Figura 25**, además del marcaje neuronal, se utilizó un contra-marcaje de los marcadores IBA1 (del inglés, *ionized calcium-binding adapter molecule 1*, nomenclatura oficial, AIF1 *Allograft Inflammatory Factor 1*) y GFAP (del inglés, *Glial fibrillary acidic protein*) con objeto de identificar la inserción de microglía y astrocitos, respectivamente. En corteza parietal la detección de astrocitos fue mínima y no se muestra. Sin embargo, se observó un incremento en las señales de marcadores astrocíticos y microgliales en el hipocampo (**Figura 24**), siendo mayor el de la microglía. No obstante, esta cuantificación no discrimina si el aumento se debe a una diferencia en la morfología/estructura/extensión de estos tipos celulares o a un aumento en el número de células detectadas.

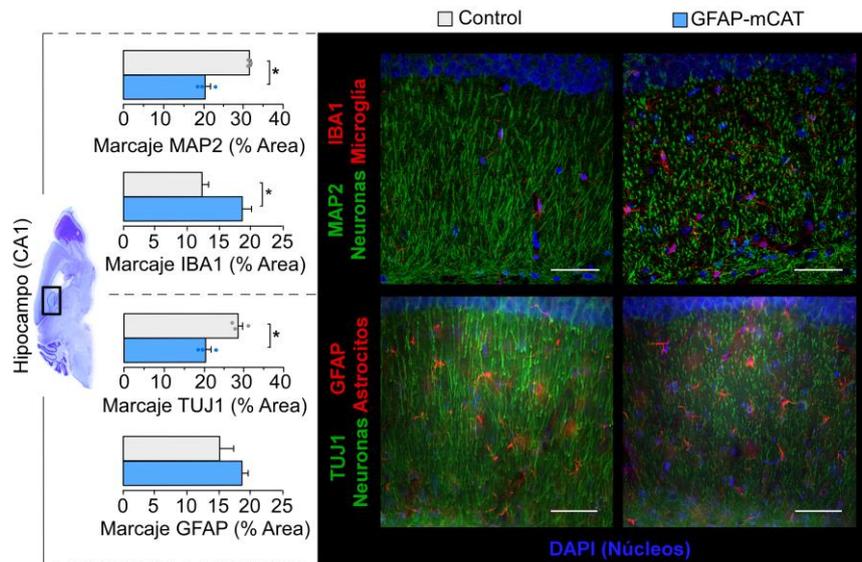


Figura 24. La reducción de los mROS astrocíticos *in vivo* induce signos de alteración en la integridad estructural de las neuronas hipocámpales. Inmunohistoquímica de la expresión de las proteínas estructurales típicas de neuronas (MAP2 y TUJ1), astrocitos (GFAP) y microglía (IBA1), en secciones sagitales de cortes seriados (40 µm) de cerebros de ratones GFAP-mCAT y Control. El análisis reveló signos compatibles con alteraciones dendríticas en las neuronas de la capa CA1 del hipocampo, en ambos marcadores estudiados, en los ratones GFAP-mCAT. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. * $P < 0,05$ ($n=3$ ratones machos por genotipo, de 14 meses; prueba t-Student). Barras de escala, 50 µm.

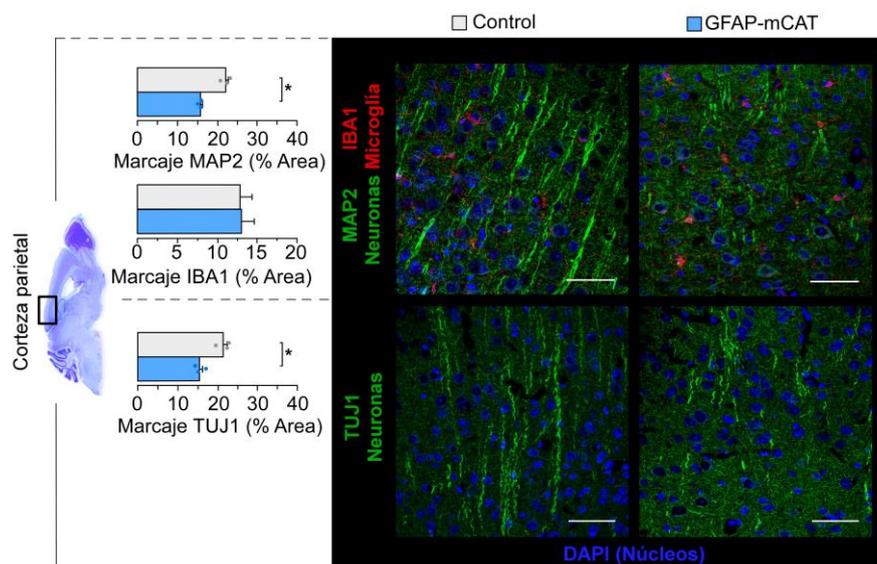


Figura 25. La reducción de los mROS astrocíticos *in vivo* induce signos de alteración en la integridad estructural de las neuronas corticales. Inmunohistoquímica de la expresión de las proteínas estructurales típicas de neuronas (MAP2 y TUJ1) y microglía (IBA1), en secciones sagitales de cortes seriados (40 µm) de cerebros de ratones GFAP-mCAT y Control. El análisis reveló signos compatibles con alteraciones dendríticas en las neuronas de la corteza parietal, en ambos marcadores estudiados, en los ratones GFAP-mCAT. Los datos son expresados como la media \pm s.e.m. * $P < 0,05$ ($n=3$ ratones machos por genotipo, de 14 meses; prueba t-Student). Barras de escala, 50 µm.

Por último, evaluamos en extractos de corteza e hipocámpos estos marcadores neuronales mediante inmunotransferencia tipo *western blot*. Sin embargo, como se observa en la **Figura 26**, no se infieren

diferencias en la abundancia total de estas proteínas mediante inmunotransferencia. Este resultado sugiere que los cambios estructurales observados son sutiles y requieren aproximaciones más adecuadas. También, se evaluaron paralelamente en estas muestras la abundancia de las proteínas pre- y post-sinápticas, sinaptofisina (SYP) y PSD95, pero tampoco observamos diferencias.

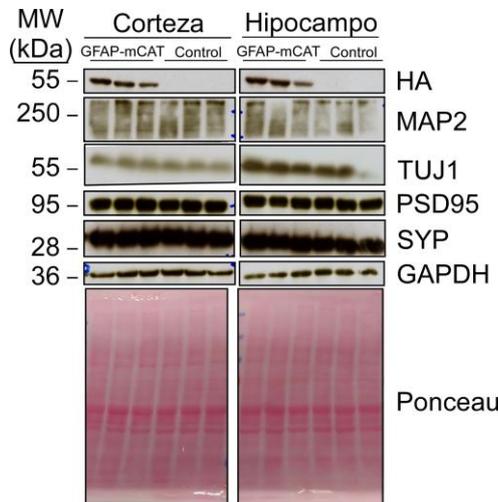


Figura 26. Expresión de marcadores neuronales, estructurales y funcionales tras la reducción de los mROS astrocíticos *in vivo*. Inmunodetección tipo *western blot* de la expresión de marcadores neuronales en extractos totales procedentes de aislamientos de hipocampos y corteza parietal. La detección de HA en las muestras GFAP-mCAT corresponde a la expresión de la proteína mCAT. De este análisis no se infieren diferencias en la abundancia total de las proteínas analizadas, estructurales (MAP2, TUJ1) o funcionales (sinaptofisina (SYP), PSD95, pre- y post-sinápticas, respectivamente). (n=3 ratones machos por genotipo).

9. Influencia *in vivo* de la señalización redox cerebral de astrocitos y neuronas en el comportamiento del ratón.

Los resultados de este trabajo revelan que la reducción *in vivo* de los mROS astrocíticos es capaz de alterar el perfil transcriptómico de los astrocitos, aspectos de la estructura neuronal y el metabolismo general del cerebro completo. Seguidamente nos propusimos evaluar la repercusión de estas alteraciones en el comportamiento espontáneo de ratones adultos machos GFAP-mCAT ($GFAP^{CreERT2/+}; mCat/+$) y Control ($+/+; mCat/+$) (8–10 meses).

La exploración de un campo abierto en la prueba de *open field* pone a prueba las capacidades exploratorias innatas de estos animales, bajo el único estímulo de un nuevo ambiente. En esta prueba, los animales GFAP-mCAT demostraron recorrer menor distancia y un menor número de levantamientos, que se considera un gesto natural de curiosidad y exploración (**Figura 27a**, paneles de la izquierda). Además, atendiendo a la distribución del tiempo invertido en cada una de las 3 áreas en las que dividimos el campo objeto de estudio para el análisis, se observó que los animales GFAP-mCAT tienen una preferencia por la región del borde próxima a las paredes que delimitan el área de estudio (**Figura 27a**, paneles de la derecha y *track plots*). Estos animales fueron sometidos a la prueba de *Rotarod* para evaluar su coordinación motora y dilucidar si los resultados de *open field* tienen un origen motor. A la vista de los resultados de esta prueba (**Figura 27b**) se concluye que no hay diferencias en la coordinación motora de estos animales y, por tanto, el fenotipo observado durante la prueba de *open field* puede entenderse como una reducción de la capacidad exploratoria en los animales GFAP-mCAT. A menudo este tipo de resultados en los que los animales tienen una mayor tendencia a la exploración de las zonas próximas a las paredes del campo de estudio, denominada thigmotaxis, también se interpreta como un síntoma de miedo y/o ansiedad asociado a transmisión dopaminérgica (Simon et al. 1994), aunque serían necesarios estudios más específicos para evaluar este tipo de respuesta. Por último, dada la afectación hipocampal de los animales GFAP-mCAT observada mediante inmunohistoquímica, se eligió una prueba para evaluar

sus capacidades cognitivas. La reducción de la capacidad exploratoria de los ratones GFAP-mCAT se confirmó en la prueba de reconocimiento de nuevos objetos (**Figura 27c**). Esta afirmación se deduce del observado descenso, estadísticamente significativo, en el número de entradas y el tiempo dedicado a la exploración del nuevo objetos. Además, esta prueba demostró que estos animales no presentan la preferencia por la novedad de un nuevo objeto que sí presentan los animales control (gráfico de índice de discriminación, **Figura 27c**).

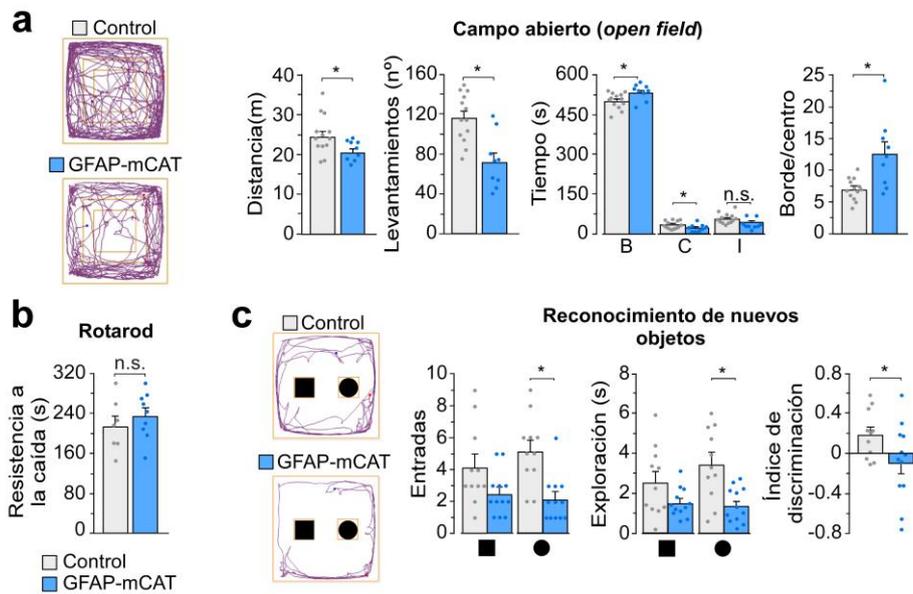


Figura 27. El análisis comportamental espontáneo de los animales GFAP-mCAT muestra signos compatibles con signos de disfunción neuronal. Todos los estudios se realizaron con ratones machos adultos (8-10 meses) tras su aclimatación a las salas de comportamiento durante un mínimo de 15 minutos en la misma franja horaria. **(a)** La prueba de campo abierto se realizó durante 10 minutos de movimiento libre en un espacio cerrado para evaluar la locomoción y exploración natural de los ratones GFAP-mCAT y Control. De este análisis se muestra (de izquierda a derecha) una imagen representativa del recorrido realizado por un animal de cada genotipo, distancia recorrida, levantamientos de dos patas, distribución del tiempo (segundos) en las áreas (B: Borde, C: Centro, I: Intermedio) y el cálculo de borde/centro [B/(C+I)]. Los datos son la media \pm s.e.m. * $P < 0,05$ (n=13 Control; n=9 GFAP-mCAT; prueba t de Student) **(b)** La prueba de rotarod consiste en un cilindro rodante acelerado (4-25 rpm, ac 4,5 rpm/min) durante un máximo de 300 segundos que evalúa la coordinación motora según el tiempo de resistencia a la caída. Los datos son la media \pm s.e.m. * $P < 0,05$ n.s., no significativo (n=7 Control; n=9 GFAP-mCAT; prueba t de Student) **(c)** La prueba de reconocimiento de nuevos objetos requiere una fase previa de familiarización con 2 cubos idénticos, tras 15 minutos de esta fase se evalúa la memoria a corto plazo sustituyendo uno de los cubos por una esfera de proporciones similares (fase de reconocimiento). De la fase de reconocimiento se muestra (de izquierda a derecha) una imagen representativa del recorrido realizado por un animal de cada genotipo, el número de entradas y tiempo (segundos) dedicado a la exploración de cada objeto y el índice de discriminación que determina la preferencia por la novedad. Los datos son la media \pm s.e.m. * $P < 0,05$ (n=11 Control; n=12 GFAP-mCAT; prueba t de Student).

A la vista de las alteraciones observadas en el comportamiento del ratón GFAP-mCAT nos propusimos evaluar si la reducción de los niveles de mROS en las neuronas mostraba diferencias comportamentales. Para ello, se evaluó el comportamiento espontáneo del modelo CamK-mCAT (introducido en **Figura 12**) utilizando ratones adultos machos CamK-mCAT ($CamK^{Cre/+}; mCat/+$) y sus

hermanos de camada control mCAT (+/+; *mCat*/+) bajo las mismas condiciones experimentales y edad (8–10 meses) que la utilizadas para la línea de ratones GFAP-mCAT.

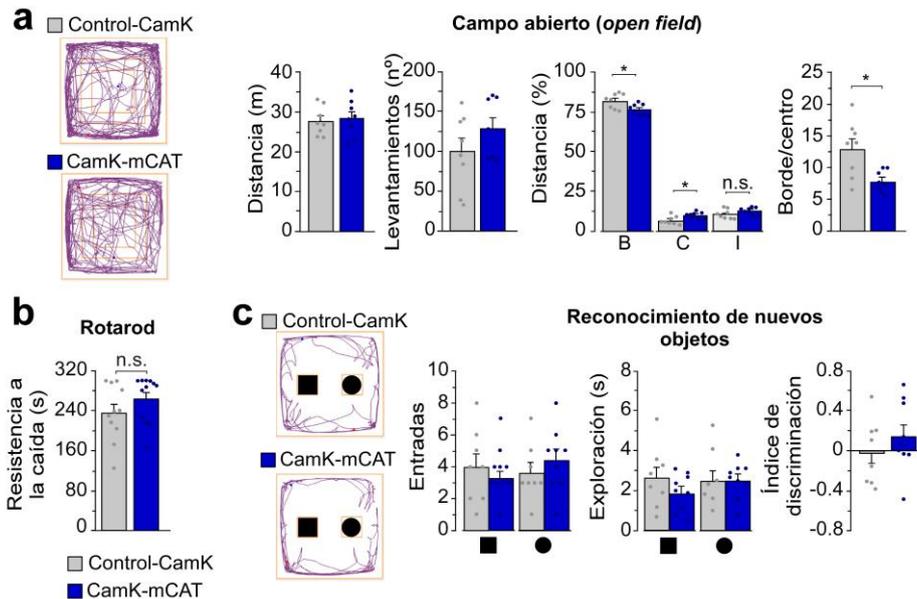


Figura 28. El análisis comportamental espontáneo de los animales CamK-mCAT no mostró efectos nocivos. Todos los estudios se realizaron con ratones machos adultos (8-10 meses) tras su aclimatación a las salas de comportamiento durante un mínimo de 15 minutos en la misma franja horaria **(a)** La prueba de campo abierto se realizó durante 10 minutos de movimiento libre en un espacio cerrado para evaluar la locomoción y exploración natural de los ratones CamK-mCAT y Control-CamK. De este análisis se muestra (de izquierda a derecha) una imagen representativa del recorrido realizado por un animal de cada genotipo, distancia recorrida, levantamientos de dos patas, distribución del tiempo (segundos) en las áreas (B: Borde, C: Centro, I: Intermedio) y el cálculo de borde/centro [B/(C+I)]. Los datos son la media \pm s.e.m. * $P < 0,05$ n.s., no significativo ($n=8$ Control-CamK; $n=9$ CamK-mCAT; prueba t de Student) **(b)** La prueba de *rotarod* consiste en un cilindro rodante acelerado (4-25 rpm, acc 4,5 rpm/min) durante un máximo de 300 segundos que evalúa la coordinación motora según el tiempo de resistencia a la caída. Los datos son la media \pm s.e.m. * $P < 0,05$ n.s., no significativo ($n=8$ Control-CamK; $n=9$ CamK-mCAT; prueba t de Student) **(c)** La prueba de reconocimiento de nuevos objetos requiere una fase previa de familiarización con 2 cubos idénticos, tras 15 minutos de esta fase se evalúa la memoria a corto plazo sustituyendo uno de los cubos por una esfera de proporciones similares (fase de reconocimiento). De la fase de reconocimiento se muestra (de izquierda a derecha) una imagen representativa del recorrido realizado por un animal de cada genotipo, el número de entradas y tiempo (segundos) dedicado a la exploración de cada objeto y el índice de discriminación que determina la preferencia por la novedad. Los datos son la media \pm s.e.m. * $P < 0,05$ ($n=8$ Control-CamK; $n=9$ CamK-mCAT; prueba t de Student).

Como se observa en la **Figura 28a**, la prueba de *open field* no mostró diferencias en la distancia recorrida, pero sí una tendencia en el incremento de levantamientos, signo de actividad exploratoria acompañado de un descenso significativo del ratio borde/centro. La tendencia a permanecer cerca de las paredes, llamada thigmotaxis, disminuye gradualmente durante los primeros minutos de exploración. Nuestra interpretación de estos resultados es que la adaptación a un nuevo espacio, evaluada en términos de la capacidad exploratoria, es mayor tras la reducción de los niveles de mROS neuronales. Este fenómeno no afecta a la coordinación motora evaluada mediante la prueba de *rotarod* en condiciones basales (**Figura 28b**). Por último, se evaluó si el fenotipo observado en la prueba de *open field* en los animales CamK-mCAT confería alguna ventaja cognitiva en el reconocimiento de nuevos

objetos que evalúa la memoria a corto plazo (**Figura 28c**). En este caso, a pesar de observar una mejoría en la discriminación del nuevo objeto, no alcanzó la significatividad, por lo que se requiere un escrutinio mayor o la elección de nuevas pruebas de comportamiento.

En su conjunto, del estudio de ambos modelos animales podemos concluir que en condiciones basales la reducción de mROS en los astrocitos (GFAP-mCAT) tiene consecuencias deletéreas que repercuten negativamente en el comportamiento natural del ratón compatibles con signos de disfunción neuronal. Mientras tanto, el estudio de la reducción de mROS en las neuronas (CamK-mCAT), aunque no puede concluir un efecto beneficioso, sí descarta consecuencias nocivas en las funciones cognitivas evaluadas en condiciones basales, donde sus niveles de mROS fisiológicos se presuponen bajos.

10. La señalización redox cerebral tiene un contexto celular.

Los resultados de las pruebas de comportamiento tras la reducción de mROS endógenos en astrocitos o neuronas con los modelos GFAP-mCAT y CamK-mCAT, respectivamente, en nuestra opinión demuestra un papel dual de la señalización redox. A la vista de nuestros resultados, los elevados mROS endógenos astrocíticos cumplen un papel funcional beneficioso, de ahí que su reducción haya demostrado consecuencias deletéreas. Sin embargo, la reducción de mROS neuronales no mostró efectos destacables. Aunque existe una tendencia en la prueba de campo abierto en que los índices de exploración son mayores que los controles, no podemos concluir que la reducción de mROS neuronales sea beneficiosa en condiciones basales. Esto podría interpretarse como que la la señalización redox neuronal no es tan relevante como la astrocítica. La interpretación funcional de este resultado tiene sentido según las diferencias en los niveles endógenos de mROS entre astrocitos y neuronas (Lopez-Fabuel et al. 2016).

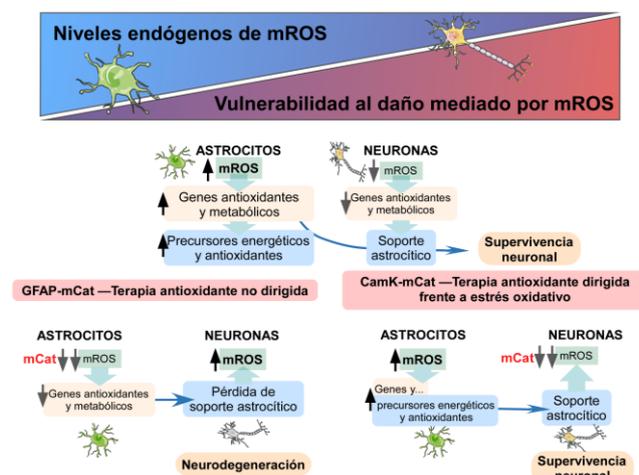


Figura 29. Aspectos celulares de la defensa antioxidante celular.

Arriba, esquema de las diferencias en los niveles endógenos de mROS entre astrocitos y neuronas y en la capacidad de su defensa antioxidante para el mantenimiento del equilibrio redox. Abajo, esquema conclusivo de la interpretación de los resultados tras la reducción *in vivo* de los mROS endógenos astrocíticos y neuronales. En condiciones basales la reducción indiscriminada e injustificada (terapia antioxidante no dirigida) conlleva consecuencias deletéreas. La terapia antioxidante dirigida a neuronas, sin afectación astrocítica, no tiene efectos y puede ser de ayuda en condiciones de estrés oxidativo (Figura 30).

Por lo tanto, las diferencias en los niveles endógenos de mROS astrocíticos y neuronales tendría una explicación fisiológica que indica que los mROS astrocíticos, y no los neuronales, tienen un papel señalizador en la fisiología cerebral. Estas diferencias también tienen importancia para explicar la vulnerabilidad neuronal al estrés oxidativo (**Figura 29**). Los elevados mROS astrocíticos precisan de una fuerte defensa antioxidante para garantizar no sólo el equilibrio redox sino evitar la desregulación de la señalización redox. Por su parte la defensa antioxidante neuronal dependen en gran medida del soporte astrocítico para su protección redox (Bolaños 2016; Fernandez-Fernandez et al. 2012). Este fenómeno

dual, pone en evidencia una problemática no contemplada en la terapia antioxidante como tratamiento de enfermedades neurodegenerativas: el origen celular de los mROS (**Figura 29**). Los modelos mCAT condicionales específicos de célula se postulan como una magnífica herramienta para evaluar esta premisa y contribuir al conocimiento que ayude a comprender el fracaso de los ensayos clínicos basados en terapia antioxidante (Heyland et al. 2013; Kamat et al. 2008; Snow et al. 2010).

Para evidenciar lo comentado anteriormente, nos propusimos utilizar un modelo de neurotoxicidad aguda en ratón con objeto de investigar 1) la eficacia del modelo mCAT como posible terapia génica neuroprotectora y 2) los aspectos celulares de un modelo de estrés oxidativo en el cerebro. Decidimos emplear la administración intraperitoneal de ácido 3-nitropropiónico (3-NP), ya que se ha descrito que, a través de su inhibición del complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, genera estrés oxidativo con origen en este orgánulo y muerte neuronal en el núcleo estriado. La susceptibilidad de las neuronas de este área del cerebro provoca un déficit motor que hace de esta aproximación un buen modelo para el estudio de la enfermedad neurodegenerativa de Huntington (Ramaswamy et al. 2007; Tunez et al. 2010; Tunez and Santamaria 2009).

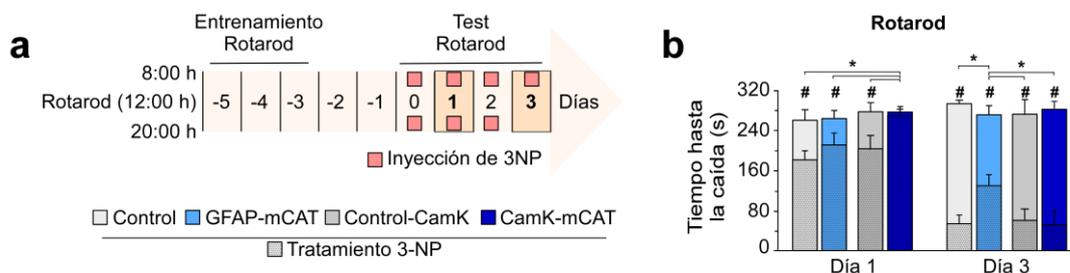


Figura 30. Aspectos celulares de la prevención antioxidante en modelos de neurotoxicidad aguda. (a) Representación esquemática del protocolo de administración intraperitoneal de ácido 3-nitropropiónico (3NP) (7 dosis totales posología de 12 horas, 50 mg 3NP/kg ratón) y análisis de la coordinación motora en la prueba de rotarod acelerado (4-25 rpm, acc 4,5 rpm/min). (b) La prueba de rotarod consiste en un cilindro rodante acelerado (4-25 rpm, acc 4,5 rpm/min) durante un máximo de 300 segundos que evalúa la coordinación motora según el tiempo de resistencia a la caída. Los datos son la media $\# P < 0,05$ (entre condición tratado/no tratado) $* P < 0,05$ (entre genotipos) \pm s.e.m. n.s., no significativo (n=11 Control; n=12 GFAP-mCAT n=8 Control-CamK; n=9 CamK-mCAT; prueba ANOVA y t de Student)

El esquema de la **Figura 30a** muestra el protocolo de tratamiento con 3-NP y la programación de la evaluación de coordinación motora mediante la prueba de rotarod en animales adultos GFAP-mCAT y CamK-mCAT, con sus respectivos hermanos de camada que no expresan mCAT como control. El análisis del comportamiento motor reveló que el tratamiento con PBS no interfiere en la coordinación motora a lo largo del tratamiento, como lo demuestran los valores de resistencia a la caída al comienzo y final de los días de tratamiento (**Figura 30b** izquierda y derecha, respectivamente). El análisis de las consecuencias del tratamiento con 3-NP requiere un mayor detenimiento. Por un lado, el panel de la izquierda de la **Figura 30b** indica que a día 1 de tratamiento, tras 3 inyecciones, tan sólo los animales CamK-mCAT presentan una resistencia estadísticamente significativa respecto a su control y similar a su condición PBS que, a nuestro juicio, subraya la susceptibilidad neuronal ante el estrés oxidativo agudo. Sin embargo, los animales GFAP-mCAT no impidieron el deterioro motor de forma significativa. Por otro lado, el panel de la derecha de la **Figura 29b** indica que a día 3, al finalizar el tratamiento, tras 7 inyecciones, tan sólo los animales GFAP-mCAT presentan una resistencia estadísticamente significativa respecto a cualquiera de los otros animales sometidos al tratamiento de 3-NP. La persistencia del daño

mediante 3-NP acaba induciendo daño incluso en aquella condición con protección neuronal (CamK-mCAT), mientras que la reducción de ROS en los astrocitos (GFAP-mCAT) ralentiza de manera significativa la aparición del daño motor observado tras el tratamiento con 3-NP, lo que refuerza el papel de los astrocitos en la homeostasis neuronal.



Discusión y perspectivas

1. La relevancia del fondo genético para la reproducibilidad de resultados.

Recientemente, se ha descrito que las cepas isogénicas más comunes de ratones C57BL/6 (6J y 6N), presentan grandes diferencias metabólicas (Fontaine and Davis 2016). Así, se comprobó que los ratones de la subcepa C57BL/6J muestran intolerancia a la glucosa y menor secreción de insulina. El mapeo de *loci* genéticos de carácter cuantitativo (QTLs, del inglés *quantitative trait locus*) de ambas subcepas identificó que el *locus* génico responsable de este fenotipo se encuentra en la región codificante del gen de la Nicotinamida (NAD) nucleótido transhidrogenasa (*Nnt* del inglés, *Nicotinamide nucleotide transhydrogenase*) (Freeman et al. 2006). Este trabajo demostró que exclusivamente en la subcepa de ratones C57BL/6J, debido a una mutación espontánea, se eliminaron los exones 7-11 de este *locus*, causando la ausencia total de la proteína NNT. Esta enzima con codificación nuclear se encuentra en la membrana interna mitocondrial, donde cataliza la reacción de transhidrogenación entre las coenzimas NADH y NADPH. En concreto, NNT favorece la reducción del NADP⁺ a expensas de la oxidación del NADH y promueve el bombeo de protones (H⁺) a la matriz mitocondrial. La pérdida de esta función impide la producción de insulina por las células β del páncreas *in vitro* y una disminución moderada de la eliminación de la glucosa *in vivo* (Nicholson et al. 2010). Otros trabajos también resaltan la importancia de NNT como fuente de NADPH mitocondrial afectando a su biología redox en aspectos como la incapacidad para las transhidrogenación entre el NAD y NADP, incrementos de H₂O₂ o mayor susceptibilidad para la permeabilidad del poro mitocondrial mediada por Ca²⁺ (Ronchi et al. 2013).

Nosotros determinamos el fondo genético de los ratones de este estudio, resultando ser C57BL/6J de acuerdo con la detección de la mutación en el gen *Nnt*. No obstante, nuestras conclusiones se basan en la comparación de hermanos de camada con el mismo fondo genético C57BL/6J. Dada la importancia del metabolismo en este trabajo no podemos ignorar la posibilidad de que los ratones mCAT puedan mostrar fenotipos diferentes bajo el fondo *Nnt-wild type* C57BL/6N o en otras cepas isogénicas, como ha sucedido con otros trabajos comparados (Hirose et al. 2016; Latorre-Pellicer et al. 2016).

2. Consideraciones del estudio de los ROS. Eficacia del modelo mCAT para el estudio de la señalización redox *in vitro* e *in vivo*.

El metabolismo y la señalización comparten nodos críticos en distintos tejidos. En el SNC, el ejemplo más destacado es el glutamato, principal neurotransmisor excitador y un intermediario metabólico esencial. En esta línea, nuestro trabajo relaciona el metabolismo y la señalización mediada a través de ROS. Así, destacamos que los ROS pueden desempeñar un papel fisiológico y que los niveles fisiológicos endógenos de ROS son dependientes del tipo celular. Por tanto, la relevancia de la señalización redox y el metabolismo debe tener en cuenta el tipo celular. Por ello, diseñamos un modelo condicional de ratón que nos permitiera reducir los niveles endógenos de ROS con el objetivo de distinguir sus efectos de los deletéreos causados por niveles supra-fisiológicos.

Para entender la naturaleza de las funciones fisiológicas de los ROS se requiere una medida lo más precisa posible de éstos. No obstante, la naturaleza reactiva de los ROS hace que la vida media de muchos de sus intermediarios sea muy baja, dificultando el desarrollo de sondas adecuadas. Por tanto, aunque existe un número creciente de herramientas para la detección de ROS, la especificidad y sensibilidad de éstas son a menudo insuficientes. En nuestro trabajo hemos utilizado sondas comerciales aceptadas como específicas para la detección de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y superóxido (O₂⁻). Aunque los

resultados obtenidos fueron similares, la metodología es distinta lo que sugiere la robustez de nuestros datos. Además, hemos considerado otra limitación del estudio redox que es la localización subcelular de los ROS (Kaludercic, Deshwal, and Di Lisa 2014). Así, el desarrollo de algunos sensores codificados genéticamente ha permitido medir ROS en diferentes compartimentos subcelulares, en células u organismos vivos intactos (Kaludercic et al. 2014; Woolley, Stanicka, and Cotter 2013). En animales superiores la compatibilidad de estas sondas con tecnología de dos fotones ofrece una primera aproximación *in vivo* (Wang et al. 2017). A falta de una alternativa, para resolver esta problemática en nuestro trabajo hemos recurrido a una estrategia *ex vivo*. Así, hemos conseguido resolver la determinación de ROS a nivel de célula individual gracias al uso de AAVs con expresión de GFP bajo el control de promotores específicos de tipo celular. Además, esta estrategia será de gran utilidad para evaluar otras respuestas celulares individuales en tejidos heterogéneos como el cerebro.

En general, el H_2O_2 es un candidato ideal como ROS señalizador ya que, tal como se mencionó en la *introducción*, su reactividad es menor, su difusión mayor y existe redundancia y una amplia distribución subcelular en los sistemas de eliminación (Lee et al. 2011; Reczek and Chandel 2015; Sies 2014a; Young et al. 2019). Esto sugiere la gran relevancia del H_2O_2 ya que sus niveles deben ser estrictamente controlados.

Nuestros resultados sugieren que el grado de reducción de mROS en astrocitos es similar tanto *in vitro* como *in vivo* y próximo al 30%. Mientras los resultados de Amplex[®] Red demuestran la eficacia de la catalasa en la descomposición de H_2O_2 , los resultados con la sonda MitoSOX[™] indican que el sistema mCAT también disminuye otras especies reactivas de oxígeno como el $O_2^{\cdot-}$. Hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos con la sonda Amplex[®] Red están realizados en el medio de incubación, lo que puede interpretarse como una medida indirecta de la producción intracelular y no sólo mitocondrial. Esto reafirma que el H_2O_2 difunde fácilmente entre compartimentos a través de acuaporinas y favorece la comunicación de la mitocondria con otros orgánulos dependientes de ROS, como el retículo endoplásmico o los peroxisomas (Sies 2014a; Yoboue et al. 2018). En su conjunto, nuestros resultados sugieren la capacidad del sistema mCAT para combatir diversos tipos de ROS en el compartimento mitocondrial, si bien la disminución de los ROS en la mitocondria podría alterar los niveles en otros orgánulos.

El estudio comportamental de los ratones GFAP-mCAT muestra que los mROS astrocíticos endógenos juegan un papel esencial en funciones neurológicas que afectan a la conducta. Esta observación contrasta con los resultados obtenidos con el modelo Camk-mCAT, en los que no encontramos alteraciones cognitivas tras la reducción de mROS en las neuronas. Este resultado sugiere que, en condiciones basales, los ROS endógenos ejercen un papel esencial para los astrocitos, pero no para las neuronas. En nuestra opinión, este hecho podría estar ligado a las destacadas diferencias en los niveles basales de mROS entre ambos tipos celulares (Lopez-Fabuel et al. 2016). Así, los astrocitos presentan altos niveles de mROS fisiológicos y, a su vez, están equipados con una gran defensa antioxidante y coordinan la capacidad antioxidante neuronal proporcionando precursores de glutatión (Bolaños 2016). Esta aparente paradoja, podría resolverse de forma lógica si pensamos para garantizar el equilibrio redox, unos altos niveles de mROS requerirán una fuerte defensa antioxidante. Además, esta solución concilia con el concepto de hormesis que se define como un factor estresante de corta duración o persistente, pero no letal, sirve para inducir los mecanismos de respuesta al estrés de un organismo y, por lo tanto, aumenta la resistencia al estrés (López-otín et al. 2013; Schieber and Chandel 2014; Schulz et al. 2007). Esto explicaría

que los astrocitos estén preparados para combatir el estrés oxidativo, asimismo su dependencia de la señalización redox fisiológica. También explicaría la compartimentación de la defensa antioxidante donde los astrocitos juegan un papel esencial y la vulnerabilidad neuronal al estrés oxidativo.

Por tanto, nuestra interpretación es que la señalización a través de ROS tiene efectos dosis-dependiente, por eso, los astrocitos con altos mROS endógenos son más dependientes de su función fisiológica beneficiosa, de ahí las consecuencias deletéreas de su reducción. En el caso de tener un origen o relación con la mitocondria, como ocurre con los mROS, este concepto se suele mencionar como mitohormesis y ha demostrado tener relevancia en garantizar un estado saludable incluso se propone como factor regulador de la esperanza de vida en diversas especies modelo (Ristow and Zarse 2010). Por último, nuestros resultados no pretenden eliminar la noción del efecto deletéreo de los mROS, al contrario, sugieren que su implicación fisiopatológica tiene más aspectos. Por tanto, la intervención de los ROS en patología no es sólo debida a unos niveles tóxicos, sino también a una desregulación fina de sus niveles fisiológicos, que desempeñan un papel funcional dependiente del tipo celular.

3. Mecanismos de señalización redox astrocítica.

A lo largo de este trabajo proponemos varias vías que pueden modularse a través de mROS astrocíticos fisiológicos, si bien no hemos investigado los mecanismos moleculares de estos cambios. De acuerdo con la *introducción*, la sensibilidad de la señalización redox tiene lugar gracias a grupos atómicos susceptibles a la acción de los ROS. En este sentido, una de las modificaciones más comunes de esta señalización tiene como diana la oxidación reversible de residuos de cisteína (Cys) (D'Autréaux and Toledano 2007; Kira M Holmström and Finkel 2014). Por tanto, para la búsqueda de dianas en nuestro trabajo que nos permitieran relacionar los cambios transcripcionales observados con la alteración metabólica, nos centramos en 2 tipos de estrategias: 1) identificar factores de transcripción sensibles a ROS y relacionados con el metabolismo y 2) inferir posibles mecanismos a partir de los datos de expresión diferencial de los astrocitos con distintos niveles de mROS en cerebro adulto.

3.1. Factores de transcripción.

El sistema NRF2-KEAP1 es un ejemplo de regulación transcripcional es esencial para adaptar la respuesta antioxidante celular a los niveles de ROS y tiene un rol principal en la colaboración astrocito-neurona (D Jimenez-Blasco et al. 2015). Como se mencionó en los *resultados*, esta vía se exploró en astrocitos mCAT, pero no fue el objeto principal de esta tesis doctoral, sino de la de Nicolás Bonora (Bonora 2018). En aquel trabajo se concluyó que los niveles de mROS astrocíticos son críticos para mantener altos los niveles de NRF2 activo, que promueve la transcripción de una batería de enzimas antioxidantes. En ese trabajo también se describió otra proteína sensible al estado redox, HDAC4 (del inglés, *histone deacetylase-4*) que, a través de mecanismos epigenéticos e intervención de microARNs, explica los cambios observados en la vía de las pentosas fosfato (PPP) (Bonora 2018). Sin embargo, ninguno de estos mecanismos sirvió para explicar la disminución del flujo glucolítico determinado en los astrocitos mCAT y la consecuente reducción del lactato observada *in vitro* e *in vivo*.

Para este trabajo, nos propusimos identificar moléculas capaces de explicar la relación de los mROS con el metabolismo glucídico. En este sentido, nos centramos en el estudio de HIF-1 α (del inglés, *hypoxia-inducible factor 1*) ya que este factor de transcripción controla la expresión de genes diana implicados en respuestas sistémicas a la hipoxia y además en respuestas celulares, como la apoptosis o el metabolismo

de la glucosa entre otras muchas funciones (Semenza 2017). A pesar de los distintos abordajes, destacados en *resultados*, no hemos podido demostrar la implicación de HIF-1 α en nuestros resultados.

La relación de estos factores de transcripción con los ROS está relacionada con las proteínas encargadas de su regulación. En el caso de NRF2, la oxidación de residuos Cys en KEAP1 tras los cambios en los niveles de ROS determina la estabilidad de NRF2. En el caso de HIF, las proteínas encargadas de detectar los niveles de oxígeno son una familia de proteínas prolina hidroxilasas PHDs (del inglés, *prolyl hydroxylase domain*) y por el factor inhibidor de HIF (FIH, codificado por el gen *Hif1an*, del inglés, *hif1, alpha subunit inhibitor*) (Schofield and Ratcliffe 2004). Distintos trabajos han sugerido que el mecanismo dependiente de oxígeno de las PHDs y FIH puede suplirse por la acción de los ROS (Greer et al. 2012; Prabhakar and Semenza 2012). Por tanto, en nuestra opinión, estas moléculas vulnerables a la acción de los ROS, como dianas directas, deberían ser el objeto de estudio en la señalización redox atendiendo a sus propiedades moleculares.

3.2. Análisis inferencial: proteínas sensibles al estado redox.

La familia de oxigenasas PDH son dependientes del Fe²⁺ de su sitio catalítico, que difiere del grupo hemo y consta de un motivo conservado de dos residuos de histidina y un carboxilato (Schofield and Ratcliffe 2004). En mamíferos, esta familia de proteínas no solo se encarga de la regulación de HIF, sino que catalizan la formación de procolágeno de la matriz extracelular, la biosíntesis de carnitina o desempeñan funciones en la reparación del ADN (Schofield and Ratcliffe 2004). El uso de quelantes de hierro, como el cloruro de cobalto, ha demostrado simular condiciones de pseudo-hipoxia a través de la inhibición de las PHDs y estabilización de HIF, un paradigma que reproduce los efectos detectados en esta ruta tras un incremento de ROS (Y. B. Zhang et al. 2014). Sin embargo, las PHDs no son las únicas proteínas asociadas a metales sensibles a la acción de los ROS. Así, por ejemplo, los grupos de hierro-azufre (Fe-S) son la principal diana del superóxido y liberan hierro como resultado del ataque oxidativo. La liberación de hierro tiene una elevada toxicidad debido al riesgo de reaccionar de nuevo con O₂⁻ y H₂O₂ mediante las reacciones de Haber-Weiss/Fenton originando radicales hidroxilo (\cdot OH), que son extremadamente tóxicos. Muchas proteínas mitocondriales, como la aconitasa o subunidades del complejo I y II mitocondrial, presentan este tipo de grupos Fe-S y son dianas comunes en diversos paradigmas asociados a una toxicidad elevada que puede ser letal (Esposito et al. 2013; Li et al. 1995).

El análisis ontológico de los genes astrocíticos con una expresión diferencial en respuesta a la disminución de ROS, reveló un gran número de genes codificantes para proteínas que presentan este tipo de grupos de unión a metales o puentes disulfuro que requieren la oxidación de residuos Cys. Aunque no se ha profundizado en un estudio individual, proponemos que pudiera existir una regulación transcripcional de genes codificantes de proteínas sensibles a ROS. La regulación conjunta de estos genes (como los de la [Tabla 1](#)) no implica una relación funcional, sino la coincidencia en sus proteínas de dominios o características estructurales comunes vulnerables a la acción de los ROS.

Otro de los grandes grupos que encontramos mediante el enriquecimiento ontológico, tras el resultado del análisis de expresión diferencial, fue la anotación de glicoproteínas. El proceso de glicosilación depende del metabolismo de carbohidratos y la mayoría de las proteínas extracelulares secretadas están a menudo glicosiladas. Esta modificación postraducciona es crítica en una amplia gama de procesos biológicos, incluyendo aspectos de la función astrocítica y señalización, como la unión de las células a la matriz extracelular y las interacciones proteína-ligando o célula-célula. Recientemente, se ha

probado que existe una comunicación redox de la mitocondria con el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi cuya labor es crítica en el proceso de glicosilación (Yoboue et al. 2018). Adicionalmente, el estrés oxidativo se ha relacionado con la acumulación de productos de glicación avanzada (AGE en inglés, *advanced glycation end products*), que consisten en la unión no enzimática de cadenas de azúcares a proteínas (Aragno and Mastrocola 2017). Este fenómeno es una marca de múltiples enfermedades neurológicas, donde su acumulación es tóxica ya que promueve la formación excesiva de ROS, respuestas inflamatorias y microgliosis. La glicosilación es, asimismo, un signo de la hiperglucemia (Miyata and van Ypersele de Strihou 2010), donde su acumulación se relaciona con cambios en el metabolismo de los polialcoholes y la utilización de la fructosa (Fisher et al. 2014; Gugliucci 2017). En este sentido, estas son dos de las rutas que hemos encontrado alterados en los animales GFAP-mCAT tras la reducción de mROS astrocíticos. Además, la desregulación del metabolismo de la glucosa junto con los intermediarios de la ruta de los polialcoholes, como la fructosa, han demostrado tener relación con los niveles cerebrales de metales como el cobre en pacientes de Alzheimer (Xu et al. 2016). Por último, también se han descrito ejemplos de regulación de glicoproteínas por ROS (Qiao et al. 2018; Van Der Reest et al. 2018) algunos relacionadas con la activación del consumo de glucosa mediante la vía de las pentosas fosfato (Rao et al. 2015). Por tanto, las proteínas susceptibles de sufrir esta modificación, a la vista de nuestros resultados, podrían ser vulnerables a la regulación por ROS.

Por último, el análisis ontológico también reveló un gran número de genes anotados en diversas vías del metabolismo (carbohidratos, proteínas, lípidos). En este sentido, los ROS endógenos o exógenos pueden activar AMPK mediante la oxidación de residuos Cys específicos que pueden modular el importe de glucosa (Liemburg-Apers et al. 2015). También se ha descrito que los ROS pueden inhibir distintas enzimas glucolíticas como la gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), la piruvato quinasa M2 (PFKM2) de nuevo a través de residuos Cys (Mullarky and Cantley 2015). Por tanto, existen ejemplos de enzimas metabólicas que por sus características estructurales son especialmente sensibles a la acción de los ROS. Así, podrían existir puntos de control de señalización redox, liderados por enzimas sensibles a los ROS, que ejercen un control transcripcional del metabolismo general.

En conjunto, los resultados del análisis transcriptómico sugieren la existencia de un efecto pleiotrópico en la regulación redox. Asimismo, deducimos que los mROS astrocíticos modulan su programa genético, pero no alteran significativamente el programa de expresión genética neuronal. En resumen, basándonos en esta estrategia inferencial, nuestros datos sugieren fuertemente que los mROS astrocíticos modulan la expresión de ciertos genes que son dianas del estado redox. Además, esta aproximación sugiere otros aspectos de la regulación redox, como las modificaciones postraduccionales.

4. Biología redox astrocítica y metabolismo cerebral.

A pesar de los múltiples cambios a nivel metabólico del cerebro en esta tesis, nos centramos en el metabolismo de la glucosa, dada la relevancia del consumo de glucosa en este tejido y la compartimentación celular entre astrocitos y neuronas en su metabolismo. Según nuestros datos, los mROS fisiológicos de los astrocitos son necesarios para mantener su alto flujo glucolítico, esencial para asegurar el apoyo metabólico neuronal dependiente del lactato (Bolaños 2016), conservado evolutivamente (Trevisiol and Nave 2015). Actualmente, este acoplamiento metabólico está cobrando nuevas dimensiones de acuerdo con los estudios que sugieren que el lactato puede funcionar como molécula señalizadora u hormona (Barros 2013; Magistretti and Allaman 2018). Nuestro trabajo también

muestra que los niveles de mROS pueden ayudar a mantener unos niveles bajos de vía de las pentosas fosfato, que tiene relevancia para el equilibrio redox y ha demostrado estar ligado a los cambios glucolíticos en múltiples paradigmas (Dunn et al. 2014; Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009).

Por tanto, de acuerdo con nuestros resultados, el metabolismo de la glucosa y los niveles fisiológicos de ROS mantienen una relación directa en los astrocitos. No obstante, en patología también podríamos inferir la existencia de esta interacción ROS-metabolismo glucídico. Por ejemplo, en los tumores sólidos que afectan a varios tipos de cáncer, las células neoplásicas adaptan su metabolismo según el denominado efecto de Warburg. Este efecto que consiste en favorecer el metabolismo glucolítico frente a la obtención de ATP mediante fosforilación oxidativa (Hsu and Sabatini 2008). HIF-1 α desempeña un papel esencial en esta adaptación metabólica. En las células del interior del tumor, en un ambiente con menor cantidad de oxígeno, HIF-1 α promueve procesos de angiogénesis para garantizar el acceso directo a la glucosa desde la sangre en el interior del tumor (Lv et al. 2017; Maxwell et al. 1997). Además, algunos autores afirman que en los tumores sólidos existe una transferencia neta de lactato desde las células más glucolíticas en el interior del tumor a aquellas más oxidativas que sobreexpresan transportadores de monocarboxilatos para la captación y utilización preferencial del lactato (Feron 2009; Hsu and Sabatini 2008). Esta colaboración entre células neoplásicas con distintas propiedades metabólicas, recuerda a la lanzadera de lactato en la que los astrocitos proporcionan este sustrato a las neuronas (Pellerin and Magistretti 2012).

A nuestro juicio, los ROS ejercen un rol esencial en la adaptación metabólica al entorno y favorece la especialización celular. En este sentido, nuestros datos sugieren que la señalización redox astrocítica es un proceso de especialización. Los astrocitos favorecidos por su plasticidad metabólica (Morita et al. 2019), sus niveles de ROS y su estrecha relación con el resto de las células del SNC, ocupan un papel central para llevar a cabo dicha señalización. De ser así, se trataría de un ejemplo más de compartimentación en el cerebro.

4.1. Reprogramación metabólica cerebral modulada por los mROS astrocíticos.

Los datos de transcriptómica y metabolómica sugieren que el control del soporte del lactato por la glucólisis y el control del equilibrio redox que ejerce la vía de las pentosas fosfato, no son los únicos objetivos de la señalización mROS astrocítica. Estas estrategias masivas sugieren la existencia de nuevas vías metabólicas, inicialmente no contempladas, en la regulación redox en el cerebro. En este sentido, la reprogramación metabólica observada en nuestras condiciones sugiere que la desestructuración neuronal y disfunción cognitiva observadas *in vivo*, responden, probablemente, a un efecto multifactorial. De igual manera para el daño neuronal que hemos demostrado *in vitro* en co-cultivo. A continuación, discutimos algunos de los cambios metabólicos que podrían contribuir a los efectos observados a distintos niveles.

Uno de los resultados obtenidos del análisis metabolómico del cerebro de ratones GFAP-mCAT es la reducción de aminoácidos que se requieren para la síntesis de serotonina (Ser, Trp), otros que pueden ser neurotransmisores (Gly). Además, sustratos para la síntesis de péptidos neuroactivos y otras sustancias biológicamente activas en el SNC como el neuropéptido Y, la sustancia P, endorfinas, encefalinas, etc. Estos datos sugieren que la vía mTOR, altamente relacionada con el metabolismo de aminoácidos y el estado energético celular (Bockaert and Marin 2015; Efeyan, Zoncu, and Sabatini 2012;

Kreft et al. 2012; Wolosker et al. 2008), podría estar regulada por el estado redox. Asimismo, hemos encontrado reducciones de algunos gamma-glutamil aminoácidos, cuyo papel puede ser esencial en el metabolismo del glutatión y la defensa antioxidante del SNC. Por otro lado, en relación con el metabolismo lipídico, observamos la alteración de múltiples ácidos grasos que pueden ser importantes puesto que su oxidación podría controlar la permeabilidad celular y la comunicación con células endoteliales (Patella et al. 2015). Aunque el análisis del tejido completo podría estar sujeto a diluciones de efectos y compensaciones, debidas a la complejidad celular y estructural cerebral. La compartimentación de los procesos metabólicos cerebrales puede ser ventajosa en la interpretación de este análisis. Por ejemplo, también en lípidos, destaca la presencia del colesterol como uno de los pocos metabolitos que se detecta incrementado en los cerebros de los animales GFAP-mCAT. La abundancia cerebral de colesterol está restringida su síntesis local, principalmente asociada a los astrocitos, siendo las neuronas las principales consumidoras (Pfrieger and Ungerer 2011). Así, la alteración astrocítica del metabolismo de colesterol produce disfunción neuronal (Ferris et al. 2017). En consonancia, es interesante destacar que identificamos incrementados varios de los genes de la síntesis de colesterol en los astrocitos aislados de cerebros adultos GFAP-mCAT.

En su conjunto, nuestros datos advierten de las implicaciones fisiopatológicas de la modulación de la señalización redox astrocítica. A nuestro juicio, los mROS astrocíticos podrían participar en el mantenimiento de la homeostasis del complejo metabolismo energético cerebral.

5. Revisión del metabolismo mitocondrial astrocítico.

Tal y como se ha mencionado en esta tesis, las mitocondrias son esenciales para el fenotipo fundamentalmente oxidativo de las neuronas, siendo los astrocitos células principalmente glucolíticas. No obstante, esta noción parece subestimar el papel que las mitocondrias juegan en los astrocitos. Nuestro trabajo resalta un posible efecto beneficioso de los ROS astrocíticos de origen mitocondrial. No obstante, a la vista de los resultados con el ratón CamK-mCAT esta función fisiológica de la mitocondria, como fuente de mROS, sugiere ser dependiente del tipo celular. Adicionalmente, como en el resto de las células del organismo, en la mitocondria de los astrocitos se lleva a cabo, además de la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa, las vías anapleróticas, la biosíntesis del grupo hemo, pirimidinas y esteroides, así como la homeostasis del calcio y el hierro y el control de la apoptosis. El metabolismo del glutamato, el principal neurotransmisor excitador y precursor del GABA, es un proceso ampliamente estudiado en el cerebro que requiere la colaboración astrocito-neurona. Su regulación constituye el mejor ejemplo de la necesidad de un ciclo tricarboxílico activo (TCA) en el compartimento astrocítico, que conecta con las reacciones anapleróticas (Lovatt et al. 2007; Schousboe et al. 2014). Así, se estima que entre el 33% y el 50% del piruvato que entra en la red mitocondrial astrocítica sirve para la anaplerosis en lugar de producir energía (Weber and L Felipe Barros 2015). Otros trabajos ponen de manifiesto la importancia de la mitocondria astrocítica en la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos (Éraso-Pichot et al. 2018). En esta tesis no hemos llevado a cabo un estudio profundo *in vitro* de estos aspectos, en favor de otros procesos más característicos del metabolismo astrocítico y aspectos mitocondriales más generales. Sin embargo, los resultados de la metabolómica muestran a una alteración general del metabolismo en el que la contribución astrocítica deberá ser más explorada, así como la intervención de los mROS en estos procesos. Por otro lado, el ADN mitocondrial (ADN_{mt}) representa un blanco crítico para el daño oxidativo. Debido a la alta generación de mROS en este orgánulo, el ADN_{mt}

está ampliamente expuesto, por lo que podría dañarse y propagar el efecto oxidativo al alterar la expresión de proteínas de la cadena de transporte de electrones (CTE) causando disfunción mitocondrial y apoptosis (Van Houten et al. 2006; Woo et al. 2012). Estos aspectos los hemos evaluado, especialmente el número de copias de ADN_{mt} y el análisis de la configuración de supercomplejos (SC) en la CTE. Sería interesante, además, evaluar si los cambios observados en algunas subunidades se traducen en cambios de otros miembros de estos complejos. Así, por ejemplo, los múltiples residuos de cisteína (Cys³⁶⁷, Cys⁵³¹, Cys⁷⁰⁴, Cys²²⁶, Cys⁷²⁷) de NDUFS1 hacen a esta subunidad especialmente sensible a la acción de los ROS, que puede ser glutationilada disminuyendo su actividad (Liemburg-Apers et al. 2015). Esto, junto con la formación de SC, podría explicar el aumento de actividad del complejo I en los astrocitos mCAT.

En cualquier caso, nosotros hemos evaluado la formación de SC, que representan estados superiores de ensamblaje entre los complejos I, III y IV, y que están estrechamente relacionados con la producción de mROS (Lopez-Fabuel et al. 2016). El complejo II, por su parte, se observa libre y no se han demostrado interacciones con otros. Nótese, que la deficiencia del factor de ensamblaje SCAFI en un fondo genético C57BL/6J como el de los ratones WT y mCAT analizados, hace imposible detectar supercomplejos con participación del IV (Acin-Perez and Enriquez 2014b; Lapuente-Brun et al. 2013). Por estos motivos, a pesar de las diferencias observadas en las subunidades SDHA y mt-CO1 de los complejos II y IV, respectivamente, no se continuó su exploración. No obstante, sería interesante estudiar, como se ha hecho con el complejo I, si los cambios observados en las subunidades de otros complejos afectan a su actividad específica.

Por último, otro aspecto de relevancia mitocondrial en la síntesis de ATP que además de su indiscutible papel energético, en el SNC la estimulación con ATP promueve exocitosis en los astrocitos y el ATP liberado desde los astrocitos es capaz de modular la transmisión sináptica neuronal o la activación de receptores P2X7 microgliales (Kreft et al. 2012; Pangršič et al. 2007; Parpura and Zorec 2010). Por último, también se ha descrito en referencia al ATP astrocítico que algunos transportadores de membrana requieren un consumo directo de ATP producido por la fosforilación a nivel de sustrato en la ruta glucolítica en lugar de la reserva total de ATP (Schousboe et al. 2011). Por tanto, en su conjunto, consideramos que además del posible efecto de la disminución del lactato en los astrocitos mCAT, otros mecanismos pueden contribuir al fenotipo neuronal observado en los ratones GFAP-mCAT.

6. Fracaso de la terapia antioxidante, nuevas consideraciones para el éxito de su traslación.

El cerebro es un tejido excepcionalmente vulnerable al estrés oxidativo (Cobley, Fiorello, and Bailey 2018). El estrés oxidativo está relacionado con la etiología de muchas enfermedades, incluidas las enfermedades neurodegenerativas en las que la disfunción mitocondrial es, del mismo modo que el estrés oxidativo, un factor común (Islam 2017). Los estilos de vida que incluyen desafíos bioenergéticos intermitentes (ejercicio, ayuno y desafíos intelectuales) fomentan un envejecimiento cerebral saludable que previene del desarrollo de alteraciones asociadas a la edad (Mattson and Arumugam 2018). Estas alteraciones incluyen, deterioros en la neuroplasticidad y resiliencia, desregulación del Ca²⁺ neuronal, alteración del estado metabólico, entre otras, que favorecen el desarrollo de enfermedades neurológicas (Mattson and Arumugam 2018). Otros trabajos, indican que la función de los ROS modula la vida media de las proteínas y su papel contrasta en ratones jóvenes frente a ratones viejos, ya que los ROS varían a lo largo de la vida (Basisty et al. 2016). En consecuencia, dada la estrecha relación entre ROS y

enfermedades asociadas al envejecimiento, la administración de compuestos antioxidantes se ha propuesto como tratamiento (Goodman et al. 2011). Esta terapia ha mostrado protección *in vitro* o en modelos preclínicos con afecciones neurológicas estrechamente relacionadas con la alteración del estado redox (Kamat et al. 2008). Desafortunadamente, la traslación de este conocimiento en ensayos clínicos ha fracasado (Halliwell 2013; Heyland et al. 2013; Snow et al. 2010). Tampoco se ha conseguido dilucidar si los ROS son causa o consecuencia del estado patológico (Andersen 2004). Igualmente se discute su contribución a la teoría del envejecimiento (Sanz 2016), en parte, porque se requiere una mejor comprensión de la interacción entre dosis y edad (Basisty et al. 2016), para evaluar la eficacia de las intervenciones antioxidantes en terapia.

Estos fracasos, han podido disminuir el entusiasmo de la investigación de neuroprotectores antioxidantes en la clínica y ponen en duda la noción general de que los ROS son deletéreos. Uno de los aspectos que puede explicar este naufragio traslacional es la escasa comprensión de los mecanismos de acción y el papel fisiológico de los ROS. En este sentido, en los últimos años los avances en biología redox han reabierto el debate con nuevos elementos interesantes para incorporar en clínica, donde la ausencia de terapias eficaces ha mantenido intacta la esperanza por este campo (Görlach et al. 2015; Juránek et al. 2013; Neves Carvalho et al. 2017; Togliatto, Lombardo, and Brizzi 2017). Por ejemplo, hay trabajos que apoyan que un cierto nivel de estrés redox durante los primeros años de vida en ratones se asocia con la protección ante el daño general en el envejecimiento (Latorre-Pellicer et al. 2016). En esta línea, otros sugieren que el efecto beneficioso de dietas ricas en vegetales o frutas, tiene un origen hormético o de preconditionamiento, ya que estos alimentos favorecen la exposición a niveles subtóxicos de algunas toxinas vegetales (Mattson and Cheng 2006).

Nuestro trabajo propone que los mROS endógenos astrocíticos cumplen una función fisiológica en la protección cerebral, como sucede con otras propuestas funciones fisiológicas celulares descritas para los ROS (Sena and Chandel 2012). Así, nuestros datos sugieren que se debe ser cauto al estudiar los papeles fisiopatológicos de los mROS en el cerebro, ya que la alta abundancia de mROS en los astrocitos, que se produce de forma natural, coexiste con una baja cantidad de mROS en las neuronas (Lopez-Fabuel et al. 2016). Además, no hay pruebas convincentes de que el consumo de altos niveles de antioxidantes nutricionales proteja contra el desarrollo de enfermedades (Halliwell 2013). Por tanto, la administración de antioxidantes, al menos en condiciones saludables, puede obstaculizar los efectos beneficiosos de los mROS astrocíticos para la función cerebral normal.

7. El papel del astrocito en funciones cognitivas y fisiopatología cerebral.

En resumen, en esta tesis doctoral describimos que la reducción de los mROS endógenos astrocíticos *in vivo* induce cambios significativos en la bioenergética y el metabolismo redox cerebral. Finalmente, estos cambios promueven la alteración de la estructura neuronal compatible con el deterioro cognitivo observado. Este tipo de defectos son comunes en el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, Parkinson, o la esclerosis lateral amiotrófica (Mattson and Arumugam 2018). Se trata de trastornos neurológicos debilitantes, típicamente acompañados de pérdida neuronal en determinadas regiones del cerebro, que pueden manifestarse como pérdida de memoria, trastornos del movimiento, parálisis y/o déficits cognitivos graves.

Tradicionalmente, la visión general de las enfermedades neurodegenerativas ha sido neuro-céntrica. Sin embargo, la importancia del soporte glial y del metabolismo para el mantenimiento de la estructura neuronal que sugiere nuestro trabajo, no es reciente (Pang, Umberger, and Geddes 2002; Vernadakis 1996), pero es una evidencia emergente. Numerosos estudios apoyan firmemente el papel de la disfunción glial (principalmente, astrocitos y microglía) en la pérdida neuronal a través de respuestas neuro-inflamatorias o mediando la neurodegeneración y también en neuroprotección en estos trastornos (Bouzier-Sore and Bolaños 2015; Gómez-Gonzalo et al. 2017; Rama Rao and Kielian 2015). Muchas patologías coexisten con una activación astrocítica caracterizada por proliferación, alteración de sus perfiles de expresión génica como la de los filamentos intermedios GFAP y vimentina que favorecen cambios morfológicos. Esta reacción se considera un mecanismo defensivo de los astrocitos dirigido a disipar el estrés agudo, limitar el daño tisular y restaurar la homeostasis (Pekny and Pekna 2014). El estudio inmunohistoquímico del cerebro de los ratones GFAP-mCAT sugiere que los mROS astrocíticos podrían modular el grado de activación de éstos y otras células, como la microglía. La activación glial suele relacionarse con un aumento de ROS, pero nuestra evidencia sugiere una relación recíproca de estos procesos. Comprender el papel multifacético de los astrocitos en el SNC sano y enfermo contribuirá, sin duda, al desarrollo de estrategias de tratamiento que modulen la astrogliosis reactiva para promover la reparación cerebral y reducir el deterioro neurológico (Burda and Sofroniew 2014; Pekny and Pekna 2014).

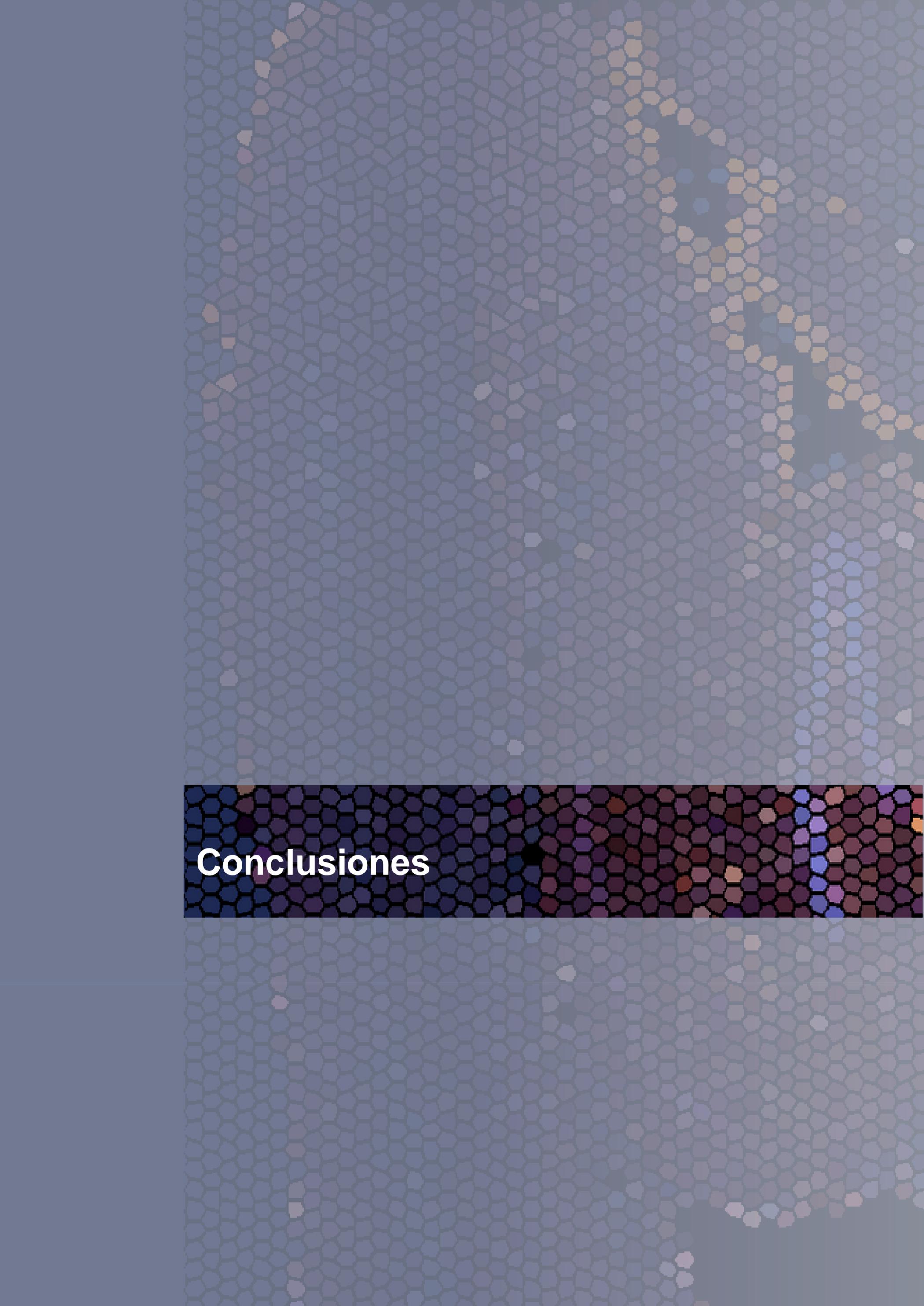
Recientemente, en línea con nuestras conclusiones *in vivo*, numerosos trabajos reconocen la importante labor astrocítica en las funciones cerebrales superiores. Entre sus tareas destacamos el control del comportamiento a través de la modulación de la plasticidad neuronal y la memoria (Adamsky and Goshen 2018; De Pittà, Brunel, and Volterra 2016). La activación astrocítica no sólo es necesaria para la plasticidad sináptica, sino para inducir una potenciación *de novo* a largo plazo (Adamsky et al. 2018). Este proceso es dependiente del NMDA en el hipocampo y mejora la memoria combinada con aprendizaje, cuando la señal se inicia en los astrocitos pero se deteriora cuando el origen es neuronal (Adamsky et al. 2018). Este trabajo sugiere que los astrocitos responden a la actividad neuronal y que, a pesar de la compartimentación cerebral, la cooperación sigue siendo un proceso obligado y coordinado.

Los astrocitos llevan a cabo una variedad de funciones que abarca desde el apoyo bioenergético y redox de las neuronas (Bolaños 2016), la eliminación de neurotransmisores de la hendidura sináptica tras la excitación neuronal, el amortiguamiento del K^+ extracelular, la regulación del flujo sanguíneo cerebral o la plasticidad neuronal mediante la regulación de la guía axonal y la sinaptogénesis (Rama Rao and Kielian 2015). Para ello, los astrocitos están dotados de una compleja maquinaria expresando los receptores y transportadores de los neurotransmisores, proteínas para la unión célula-célula, hemicanales, las enzimas específicas para el acoplamiento metabólico, además de la capacidad de secretar numerosos factores en el medio extracelular que ejercen efectos paracrinos sobre las neuronas. Cualquier perturbación en una o más de estas funciones astrocíticas puede afectar profundamente la homeostasis neuronal, como se evidencia en las enfermedades neurodegenerativas agudas y crónicas. Los elevados niveles de mROS astrocíticos, en nuestro entendimiento, forman parte de estas funciones y por eso deberían tenerse en cuenta a la hora de proponer terapias antioxidantes contra enfermedades neurodegenerativas, así como para estudiar la fisiología habitual del cerebro.

8. Perspectivas futuras y utilidades del modelo mCAT.

A nuestro juicio, el modelo mCAT representa una herramienta muy interesante en el campo de la neurociencia para el estudio fisiopatológico de los mROS en el SNC. En primer lugar, es un excelente mecanismo para seguir evaluando la función fisiológica de los mROS astrocíticos como moléculas señalizadoras en el cerebro. Este trabajo sugiere que, además del metabolismo de la glucosa, existen otras vías del metabolismo afectadas por la modulación de los mROS de los astrocitos, que requerirá un estudio futuro en profundidad. Así, sería interesante explorar el papel de los 37 genes identificados (**Tabla 1**) por su expresión diferencial tras la reducción de mROS astrocíticos, con elementos que los convierten en potenciales dianas directas de los mROS. Entre sus funciones encontramos el metabolismo, el transporte de pequeñas moléculas o la señalización. Otro de los aspectos que puede ser objeto de estudio con este modelo, es la evaluación progresiva del fenotipo comportamental e histológico a lo largo de la edad del ratón. Para ello, el modelo GFAP-mCAT presenta la ventaja de ser inducible por lo que podría caracterizarse tras la activación del sistema mCAT en distintas etapas. Por último, dado que la presencia astrocítica es variable en las distintas regiones cerebrales, se podría estudiar si hay regiones y, por tanto, funciones cerebrales más sensibles a la modulación de los mROS astrocíticos. El hipocampo es una región con un alto porcentaje de astrocitos GFAP⁺ y trabajos recientes sugieren la intervención astrocítica en la disfunción neuronal a nivel hipocampal y formación de la memoria (Adamsky et al. 2018; Ishii et al. 2016), así como diferencias en los niveles de ROS en distintas regiones hipocampales de ratón (Fujikawa et al. 2016). Por tanto, mediante cirugías estereotáxicas y AAVs-GFAP-Cre se podría activar el sistema mCAT en áreas cerebrales de interés, como el hipocampo. La reducción exclusiva de los mROS astrocíticos en estas áreas, permitiría estudiar fenotipos comportamentales asociados al área correspondiente.

En segundo lugar, los estudios *in vitro* con inhibidores de la respiración mitocondrial demostraron que el sistema mCAT también es útil en la eliminación de niveles tóxicos de ROS. Así, la expresión mCAT en el modelo *in vivo* de neurodegeneración aguda causada por el ácido 3-nitropropiónico utilizado, otro inhibidor de la respiración mitocondrial, demostró una protección al tratamiento. Aunque existen otros modelos genéticos basados en la sobreexpresión de enzimas antioxidantes, la catalasa no presenta interacciones y hemos demostrado su eficacia *in vivo*. Adicionalmente, el modelo mCAT condicional resuelve una de las conclusiones planteadas en este trabajo, como es el hecho de que los niveles de ROS son inherentes al tipo celular. Nuestro trabajo *in vivo* pone en evidencia diferencias en la respuesta astrocítica y neuronal, frente a un estrés oxidativo agudo promotor de neurodegeneración. Así, concluye que la consideración de aspectos como el origen celular de los ROS podrían mejorar la eficacia de los tratamientos antioxidantes, mientras que su uso indiscriminado, injustificado, podría estar contraindicado si interfiere con la señalización redox astrocítica. Por tanto, este modelo representa una herramienta muy útil para abordar el efecto fisiopatológico de los ROS en la etiología de cualquier modelo de enfermedad, pudiendo valorar aspectos celulares de los efectos de los ROS, dirigiendo la expresión de mCAT al tipo celular de interés en cada modelo de estudio.

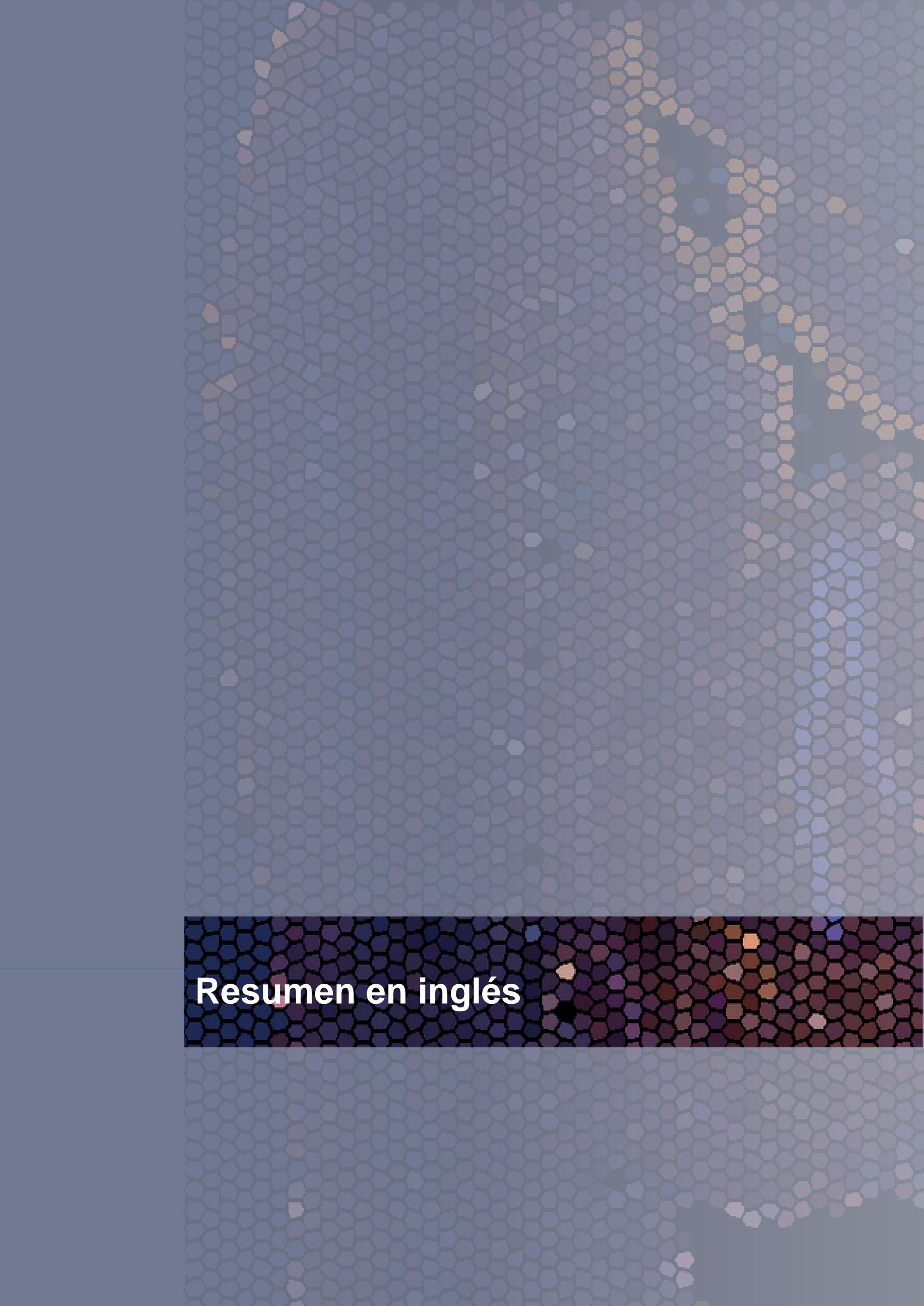


Conclusiones

Conclusiones

A la luz de los resultados presentados en esta tesis doctoral, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

1. Hemos generado dos versiones, una constitutiva y otra condicional, de un modelo de ratón que permite la expresión funcional de una catalasa marcada mitocondrialmente (mitoCatalasa o mCAT).
2. Utilizando esta estrategia, demostramos que es posible obtener una reducción significativa en los niveles endógenos de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mROS) en astrocitos *in vitro* e *in vivo*.
3. En los astrocitos, los altos niveles de mROS astrocíticos son necesarios para:
 - a. Modular cambios transcripcionales relacionados con el metabolismo celular y la señalización redox.
 - b. Mantenimiento de la configuración estructural de la cadena de transporte de electrones
 - c. Regular fisiológicamente el metabolismo de la glucosa al promover la glicólisis y reprimir la vía de las pentosas fosfato (PPP).
4. En las neuronas, los altos niveles de mROS astrocíticos controlan la supervivencia neuronal regulando la bioenergética y el metabolismo redox.
5. En el cerebro, la estrecha relación entre los distintos tipos celulares sugiere que los altos niveles de mROS astrocíticos son necesarios para mantener un metabolismo propio, adaptado a los requerimientos de su alta demanda energética.
6. La reducción *in vivo* de los mROS endógenos astrocíticos en ratones GFAP-mCAT perturba la estructura e integridad neuronal, según el análisis inmunohistoquímico, y causa deterioro cognitivo.



Resumen en inglés

Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour

ABSTRACT

Brain energy conservation requires cooperation between metabolically distant cell types, notably neurons and astrocytes. Neurons, which strictly depend on mitochondrial oxidative phosphorylation for function and survival, utilize easily oxidizable substrates supplied by astrocytes, which rely upon glycolysis. Therefore, the mitochondrial respiratory chain is tightly organized and efficient in neurons, but loosely assembled and less efficient in astrocytes. Consequently, the mitochondrial generation of reactive oxygen species (ROS) is minimized in neurons and relatively elevated in astrocytes. However, whether the naturally abundant mitochondrial ROS in astrocytes have any physiological function is unknown. To address this issue, a genetically-engineered mouse was herein generated to persistently lessen mitochondrial ROS in astrocytes during adulthood. Transcriptomics, metabolomics, biochemical, immunohistochemical and behavioural scrutiny of these mice revealed significant alterations in specific pathways of brain redox, carbohydrate, lipid and amino acid metabolic pathways affecting neuronal function and mouse behaviour.

We find that astrocytic mitochondrial ROS (mROS) regulate at least glucose utilization via glycolysis and pentose-phosphate pathway. This process is essential to ensure the metabolic support that astrocytes exert on neurons, which modulates neuronal bioenergetics and, potentially, survival. Our data provide further molecular insight into the metabolic cooperation between astrocytes and neurons and demonstrate that astrocytic mitochondrial ROS are important regulators of organismal physiology sustaining brain metabolism and neuronal function *in vivo*.

INTRODUCTION

Brain functioning is energetically a highly demanding process (Bolaños 2016) that requires the metabolic cooperation of different cell types (Magistretti 2011; Parpura et al. 1994; Parpura and Zorec 2010; Perea, Sur, and Araque 2014). Thus, astrocytic-derived lactate sustains memory consolidation (Bélanger et al. 2011; Magistretti and Allaman 2015) by serving as an energetic oxidizable substrate for neurons (Pellerin et al. 2007) and, possibly, a signaling molecule (Magistretti and Allaman 2018). Oligodendrocytes were recently uncovered to collaborate with astrocytes in this lactate shuttle to neurons (Barros 2013; Philips and Rothstein 2017). Factors known to support this brain metabolic compartmentalization involve different regulation of glycolytic enzymes (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009) and mitochondrial respiratory chain organization (Lopez-Fabuel et al. 2016) between neurons and astrocytes.

Astrocytes profusely express 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009; Y. Zhang et al. 2014), a glycolytic-promoting enzyme that maintains this pathway constitutively active¹⁰. In contrast, PFKFB3 is continuously degraded in neurons to slow down glycolysis (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009), making these cells avid of easily metabolically oxidizable substrates, such as lactate (Pellerin and Magistretti 1994, 2012). Therefore, neurons and astrocytes intrinsically differ in their fashion to metabolically conserve energy, being mainly glycolytic in astrocytes and oxidative in neurons (Almeida et al. 2001, 2004). In agreement with this notion, the organization of the mitochondrial respiratory chain is divergent in these two cell types in order to adapt their energetic efficiencies at oxidizing NAD⁺-linked substrates. In neurons, mitochondrial complex I is tightly assembled to complex III to keep high the energetic efficiency of the mitochondrial respiratory chain, whereas in astrocyte the proportion of unassembled (free) complex I is higher, accounting for lower energetic efficiency (Lopez-Fabuel et al. 2016). Consequently, complex I is a weak ROS producer in neurons, whereas in astrocytes complex I generate ROS at about one order of magnitude faster (Lopez-Fabuel et al. 2016). Since this is a naturally set up, the differential production of ROS should not have any pathological consequences. Physiological ROS, particularly H₂O₂, act as bona fide second messengers. However, whether there is any physiological significance of such a differing ability to produce ROS by these major brain cell types is unknown. Here, we explored this possibility *in vivo* by studying the metabolic and behavioural consequences of the persistent reduction of astrocytic mitochondrial ROS during adulthood in mice. The data indicate remodelling of metabolic pathways and cognitive impairment, thus uncovering a previously unrecognized physiological function for astrocytic mitochondrial ROS (mROS) in regulating brain metabolism and neuronal function.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

At the light of the previous observation, we hypothesize that differences in the levels of endogenous mROS between astrocytes and neurons determine neural cell-specific redox biology. We propose that astrocytic endogenous mROS could play physiological roles and are beneficial for the brain because they actively and locally promote metabolic and antioxidant support to neurons. To test this hypothesis, we aim to address the following specific objectives:

1. To generate a mouse model able to down modulate endogenous mROS in astrocytes.
2. To investigate whether endogenous mROS maintain metabolic functions in astrocytes.
3. To assess *in vitro* and *in vivo* whether energy metabolism, antioxidant status and survival of neurons depends on mROS-induced responses in astrocytes.

RESULTS

Generation of a conditional mouse that reduces mROS in astrocytes in cultured cells and *in vivo*.

To down-regulate endogenous mitochondrial ROS (mROS) abundance, we generated, by homologous recombination in the *Rosa26* locus (*Gt(ROSA)26Sor*), a transgenic mouse harboring the full-length cDNA of catalase fused to the cytochrome c oxidase subunit VIII-mitochondrial leading sequence, and to the human influenza hemagglutinin (HA) for tagging purposes (mitochondrial-tagged catalase) (**Figure 1a**). This construct has been shown to be efficiently imported into mitochondria while maintaining its activity (Acín-Pérez et al. 2014). A floxed (*LoxP*-flanked) transcriptional STOP cassette was incorporated between the mitochondrial-tagged catalase cDNA and the CAG promoter (*mCAT^{LoxP/+}*), in order to eventually obtain tissue- and time-specific expression of mitochondrial-tagged catalase *in vivo* (**Figure 1a**). *mCAT^{LoxP/+}* mice, bred under a C57BL/6J background, was mated with human cytomegalovirus minimal promoter (CMV)-Cre recombinase C57BL/6J mice (CMV-Cre/+). This led to a CMV-Cre/+; *mCAT/+* mouse that was backcrossed with C57BL/6J mice to constitutive express mitochondrial-tagged catalase (*mCAT/+* or *mCAT* mice) (**Figure 1a**). Astrocytes in primary culture obtained from *mCAT* or littermate wild type (WT) mice, revealed efficient expression of catalase confined to mitochondria, as judged by western blotting in whole cells (**Figure 1b**), subcellular fractions (**Figure 1c**) and by immunofluorescence (**Figure 1d**). The efficacy of the expressed mitochondrial-targeted catalase construct to down modulate mitochondrial ROS was also validated, as judged by the ability of astrocytic isolated mitochondria to remove exogenous H₂O₂ (**Figure 1e**), as well as to decrease endogenous mitochondrial ROS assessed by different techniques (**Figure 1f, g**).

To achieve down-modulation of mitochondrial ROS in astrocytes *in vivo*, *mCAT^{LoxP/+}* mice was mated with mice harboring the estrogen receptor (ERT2)-inducible (tamoxifen-dependent) Cre recombinase (Cre^{ERT2}) governed by the astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter (GFAP-Cre^{ERT2/+}) (Hirrlinger et al. 2006) (**Figure 1a**). The progeny, namely GFAP-Cre^{ERT2/+}; *mCAT^{LoxP/+}*, and +/+; *mCAT^{LoxP/+}* littermates, at the age of 8 weeks were intraperitoneally injected with tamoxifen to activate Cre recombinase activity in astrocytes *in vivo*. The resulting mice, namely GFAP-Cre^{ERT2/+}; *mCAT/+* (henceforth GFAP-*mCAT*) and +/+; *mCAT^{LoxP/+}* littermates (henceforth Control) (**Figure 1a**) were analyzed during adulthood. The recombination event induced by Cre recombinase after tamoxifen treatment, was assessed by PCR in adult mice, resulting specifically of GFAP-*mCAT* animals (**Figure 2a**) in the brain but not in other evaluated tissues (**Figure 2b**).

To confirm the occurrence of mitochondrial-tagged catalase in astrocytic mitochondria in the adult GFAP-*mCAT* mice, whole brain cells were acutely dissociated, and astrocytes purified using an immunomagnetic approach (**Figure 2c**). Effective expression of mitochondrial-tagged catalase was confirmed by western blotting (**Figure 2d**), immunostaining performed in the astrocytic fraction (**Figure 2e**) and by H₂O₂ production assessment (**Figure 2f**). To strengthen the functional efficacy of mitochondrial catalase, we determined mitochondrial ROS in astrocytes acutely dissociated from the GFAP-*mCAT* mouse brain. For this, brain cells were isolated from mice previously injected, through the retro-orbital venous sinus, with adeno-associated viruses (AAVs) expressing the green fluorescence protein (GFP) under the control of a short version of GFAP astrocytic promoter. Cells were then subjected to mitochondrial ROS assessment by flow cytometry analysis using MitoSox[®], which revealed a 25% reduction in the GFAP-*mCAT* astrocytes (**Figure 2g**). In turn, the fraction of GFP negative cells did not

show a decrease in mROS levels demonstrating the astrocytic exclusivity of the GFAP-mCAT system (data not shown). Thus, an experimental model was generated to investigate the biological consequences of reducing naturally abundant mitochondrial ROS in astrocytes in cultured cells and *in vivo*.

Transcriptomics analysis of freshly isolated astrocytes from the adult GFAP-mCAT mice.

Next, we aimed to investigate whether reduction of mitochondrial ROS in adult astrocytes altered the transcriptional profile *in vivo*. To do so, astrocytes were acutely isolated from the brains of adult GFAP-mCAT and control mice by the immunomagnetic approach. Total RNA was purified and subjected to a whole-genome transcriptomics array analysis, which revealed a total of 643 transcripts showing statistically significant differential expression levels between astrocytic samples derived from GFAP-mCAT and controls adult mice, as shown in the volcano plot (setup at p-values <0.05 and 1.3-fold change) (**Figure 3a**), of which 580 genes were functionally annotated and systematically analyzed according to the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) bioinformatic resource (Huang, Brad T Sherman, et al. 2009; Huang, Brad T. Sherman, et al. 2009). Representation of the color-scale heatmap in a base-2 logarithmic scale, and the hierarchical clustering in a dendrogram shows a wide range of expression levels across the transcripts with statistically significant differential expression, and a preference for the highly expressed transcripts in the GFAP-mCAT astrocytes (in red) (**Figure 3b**). The pie chart (**Figure 3c**) illustrated that among most genes with a statistically significant differential expression, we find a large number of genes belonging to the group of multiple complexes (orange color in both, up-regulated and down-regulated groups). This might suggest that modulation of endogenous mROS levels may affect the function of multicomplex proteins through transcriptional regulation of genes coding for subunits especially susceptible to the direct action of mROS. This fact does not imply that there are no functions associated with unique proteins that are not modulated through mROS-mediated regulation of their gene. Also, noteworthy (especially in the down-regulated group) is the large number of transcripts annotated as non-coding, which makes their interpretation more difficult but no less relevant to mROS-mediated transcriptional modulation (**Figure 3c**).

Analysis of the subcellular localization of the altered transcripts in the GFAP-mCAT astrocytes reveals that transcriptional changes affect genes associated with different organelles. In this analysis highlighted the preference for up-regulated genes encoding proteins associated with mitochondrion, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lysosome and peroxisome, and no preference for genes encoding nuclear, membrane or cytoplasmic proteins; genes coding for ribosomal proteins were mainly down-modulated in the GFAP-mCAT mice (**Figure 3d**). This fact suggests that through transcriptional modulation mitochondrial ROS can regulate cell functions in different organelles. A bioinformatic study using the DAVID and the Integrated Molecular Pathway Level Analysis (IMPALA) tools allowed us to group the list of altered transcripts according to groups of function-related genes. Gene groups that were filtered according to their relevance, which indicated that the filtered clusters of genes could be subdivided into two main groups, namely ROS-sensitive and metabolism (**Figure 3e**). In ROS-sensitive cluster we grouped genes annotated with structural elements ROS-sensitive i.e. metal-ion binding domains, disulfide bond, etc. with others not easily related to ROS-signaling but otherwise, due to the high number of genes annotated for the same function, make them very representative of the altered transcripts after astrocytic mROS modulation i.e. glycoprotein, signal peptide, post-transcriptional protein modification which could warn about the new roles of ROS-signaling. The Venn diagram of the ROS-sensitive group revealed a set of 37 transcripts having the common term signal peptide, disulfide bond and glycoprotein

(Figure 3f). These features strongly suggest that this set of genes could be particularly sensitive to ROS. To decipher their possible function(s), we next performed an enrichment analysis using the IMPaLA tool, which indicated that these genes are involved in metabolism, transport of small molecules, signal transduction, post-translational protein modification and axon guidance (**Figure 3g**). On the other hand, the Venn diagram of the metabolism group revealed that all genes coding for metabolism of carbohydrates and lipids belong to the metabolism cluster (**Figure 3h**). However, our study has not furthered the function of these genes in our GFAP-mCAT model although we believe that this inferential analysis may be useful to discover new targets of mROS action such as glycoproteins. We highlight this process due to glycosylation depend on carbohydrate metabolism and most of secreted extracellular proteins are often glycosylated and this fact is critical for a wide range of biological processes, including cell attachment to the extracellular matrix and protein–ligand interactions especially relevant in astrocyte function. Also, this post-translational modification is a critical function of the biosynthetic-secretory pathway in the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus strongly related with mitochondrial function (Yoboue et al. 2018). In addition, we can find already examples of regulation of glycoproteins by ROS in the literature (Qiao et al. 2018; Rao et al. 2015; Van Der Reest et al. 2018). Altogether, these data strongly suggest that mitochondrial ROS, through redox protein modifications, modulate the expression of redox and energy metabolism genes in astrocytes.

Metabolomics analysis of the brains from the adult GFAP-mCAT mice.

In order to ascertain whether the altered gene expression in GFAP-mCAT astrocytes correlates with changes in metabolic pathways, we performed an untargeted metabolomics study in the brain extracts of the GFAP-mCAT and control mice. Principal component analysis (PCA) suggests only mild differences between groups (**Figure 4a**), likely since the metabolomics study was performed in whole brain extracts, although only one neural cell type, i.e., the astrocyte, was genetically altered. Despite this, the volcano plot (**Figure 4b**) revealed 53 metabolites (4 increased, 49 decreased) statistically significant altered ($p < 0.05$) in the GFAP-mCAT mice. Likewise, we found 40 more metabolites (8 increased, 32 decreased) that, although did not reach the statistical significance, they still preserved a high confidence level (90%; $0.05 < p < 0.10$). The relative abundance of the filtered metabolites with their individual values is represented in a the heatmap, easily appreciating their differences (**Figure 4c**). Networks analysis of these metabolites was performed using the Cytoscape tool identifying significantly altered amino acid, nucleotide, lipid, carbohydrates and cofactors/vitamins metabolic pathways (**Figure 4d**), in good agreement with the transcriptomic analysis. Given that, at the light of the networks and integrative analyses, the brain of the GFAP-mCAT mice showed altered pathways related to metabolism, in particular, redox (glutathione) metabolism and also glucose-consuming pathways such as the pentose phosphate pathway (PPP) and glycolysis (**Figure 4d**).

Pentose-phosphate pathway (PPP) is increased and glycolysis decreased in astrocytes from the mCAT mouse.

Since, according to the metabolomics and transcriptomics network data, the brain of the GFAP-mCAT mice show biochemical signs of altered carbohydrates metabolism. We sought to analyze the ratios of metabolites of pentose-phosphate and glycolytic pathways obtained in the metabolomic approach. As shown in **Figure 5a**, the ribose-5-phosphate/6-phosphogluconate ratio increased, and the pyruvate/glucose ratio decreased in the GFAP-mCAT mice, likely indicating increased PPP and decreased

glycolysis. We next aimed to confirm this end evaluating the flux of glucose consume in both pathways in the intact astrocytes mCAT and WT counterpart, *in vitro*. We assessed the rate of $^{14}\text{CO}_2$ production from mCAT astrocytes incubated in the presence of $[1-^{14}\text{C}]$ -glucose, which is decarboxylated in the PPP and in the tricarboxylic acid (TCA) cycle (Bouzier-Sore and Bolaños 2015). As shown in **Figure 5b** (left panel), $^{14}\text{CO}_2$ production from $[1-^{14}\text{C}]$ -glucose significantly increased in mCAT when compared with control astrocytes; however, the rate of $[6-^{14}\text{C}]$ -glucose oxidation, which takes place exclusively in the TCA cycle (Bouzier-Sore and Bolaños 2015) was unaffected (**Figure 5b**, middle panel). Thus, the difference between the rates of oxidation from $[1-^{14}\text{C}]$ - and $[6-^{14}\text{C}]$ -glucose, which reflects the rate of glucose oxidation via PPP (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009), increased by 1.4-fold in the mCAT astrocytes (**Figure 5b**, right panel). These data suggest that naturally occurring mROS in astrocytes physiologically suppress PPP activity. We demonstrate that this mechanism involves an epigenetic mechanism that involves the oxidation of two cysteine residues of a specific redox-sensitive histone deacetylase, HDAC4, which accumulates in the nucleus in its reduced state represses the transcription of miR-206, which degrades the newly synthesized mRNA of several PPP-related genes (data not shown in this summary, included in Ref. Vicente-Gutierrez, C. Bonora, N. et al.) (Ago et al. 2008; Singh et al. 2013; Vicente-Gutierrez et al. 2019). Notably, we observed that mCAT astrocytes showed a decrease in the rate of glycolysis, as judged by the decreased lactate release when compared with WT astrocytes (**Figure 5c**) and the glycolytic conversion of $[3-^3\text{H}]$ -glucose into $^3\text{H}_2\text{O}$ (**Figure 5d**). Given the outstanding importance of astrocytic glycolytic activity for neuronal support, we assessed the metabolism of glucose by the brain *in vivo*. For this purpose, control and GFAP-mCAT mice were injected with a single intraperitoneal bolus of $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose. As shown in **Figure 5e** the measurement of normalized levels of $[3-^{13}\text{C}]$ -lactate derived from *in vivo* consumption of $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose detected by nuclear magnetic resonance (^{13}C -NMR), was lower in GFAP-mCAT brain extracts which is the demonstration of the ROS-mediated glycolytic flux reduction *in vivo*. These results are in good agreement with the notion that PPP and glycolysis are mutually affected pathways in several experimental paradigms (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009). Altogether, these metabolic reprogramming indicate that mROS physiologically regulates glucose metabolism in astrocytes by repressing PPP and promoting glycolysis.

Reprogramming of glucose metabolism in mCAT astrocytes leads to neuronal damage.

At the light of the metabolic and redox changes caused by mROS down modulation in astrocytes, and the metabolic dependence of neurons upon astrocytes (Bolaños 2016; Magistretti and Allaman 2015, 2018), we next investigated whether neuronal function and survival were affected by the decrease in mitochondrial ROS in mCAT astrocytes. Transcriptomics analysis of wild type neurons freshly isolated from adult GFAP-mCAT and control mice (**Figure 6a**) failed to identify statistically significant differences in the transcriptome due to the majority of genes with statistically significant differences (**Figure 6b**) present low levels of expression (in green) in both genotypes (**Figure 6c**). Whilst these data indicate that astrocytic mROS do not significantly affect gene expression in neurons, this approach may not reveal possible post-transcriptional modifications or other mechanisms of astrocyte-neuronal communication. Neuronal functions strongly depends on astrocytic metabolism and redox status (D Jimenez-Blasco et al. 2015; Vicente-Gutierrez et al. 2019). To ascertain this, we next aimed to evaluate whether the downmodulation of mROS in mCAT astrocytes could regulate neuronal survival. Hence, we performed co-cultures of mCAT astrocytes with wild type neurons (**Figure 6d**), which were analyzed after the

removal of astrocytes. As shown in **Figure 6e** (left panel), mCAT astrocytes caused an increase in neuronal cell damage as shown the increased abundance of the 17 kDa the caspase 3 (CSP-3) cleaved active fragment. This result was further confirmed by the measurement of CSP-3 activity, which was evaluated in co-cultured neurons under basal conditions. AMC (7-amino-4-methylcoumarin) release, a marker of CSP-3 activity, was higher in neurons co-cultured with mCAT astrocytes in basal conditions **Figure 6e** (right panel). Thus, naturally occurring mROS in astrocytes contributes to maintaining the support and protection of neighbor neurons.

Reduction of mitochondrial ROS in astrocytes *in vivo* alters neuronal integrity and causes cognitive impairment in mice.

In view that our data suggest that mROS in astrocytes, by regulating bioenergetics and redox metabolism, control neuronal status, we next aimed to verify whether decreased mROS in astrocytes functionally affect neurons *in vivo*. Analysis of brain sections obtained from the GFAP-mCAT mice by Nissl staining revealed no major anatomical alterations in the brain structures (**Figure 7a**). However, MAP2 and TUJ1 staining revealed signs compatible with cytoskeletal alterations in neurons of the CA1 layer of the hippocampus and the parietal cortex (**Figure 7b**) in the GFAP-mCAT mice but not in the control mice. These data indicate that the decrease in mROS in astrocytes *in vivo* may negatively affect the neuronal structural integrity, although this conclusion would require further validation by measuring the cell-body layer thickness and the number of spines in Golgi-stained neurons. Nevertheless, given that dendrite disruption in the hippocampus is associated with several forms of cognitive decline (Bobo-Jiménez et al. 2017), we then subjected the GFAP-mCAT mice to a behavioural scrutiny. The total distance travelled in the open-field test was significant decreased ~20% (**Figure 7c**). Moreover, a significant increase in the ratio spent in the periphery versus the centre areas was observed along with a decrease in the number of rearings (**Figure 7c**), thus indicating an alteration in the explorative capacity. The motor coordination was evaluated by rotarod test and the results confirm that the changes observed in open-field are not ligated to motor coordination which was unaffected in the GFAP-mCAT mice (**Figure 7d**). To more specifically address cognitive affection, we performed novel object recognition tests. The number of entries and the exploring time spent with the novel object (sphere) decreased (**Figure 7e**), thus strengthening the results obtained in the open-field test. Interestingly, the discrimination index was significantly lower in the GFAP-mCAT mice than the control mice, mice have an innate preference for novelty and its absence may be associated with loss of short-term memory. These data indicate that the reduction of mROS specifically in astrocytes *in vivo* perturbs neuronal integrity, as judged by neuron structure analysis, and causes cognitive impairment in mice.

Figure 1

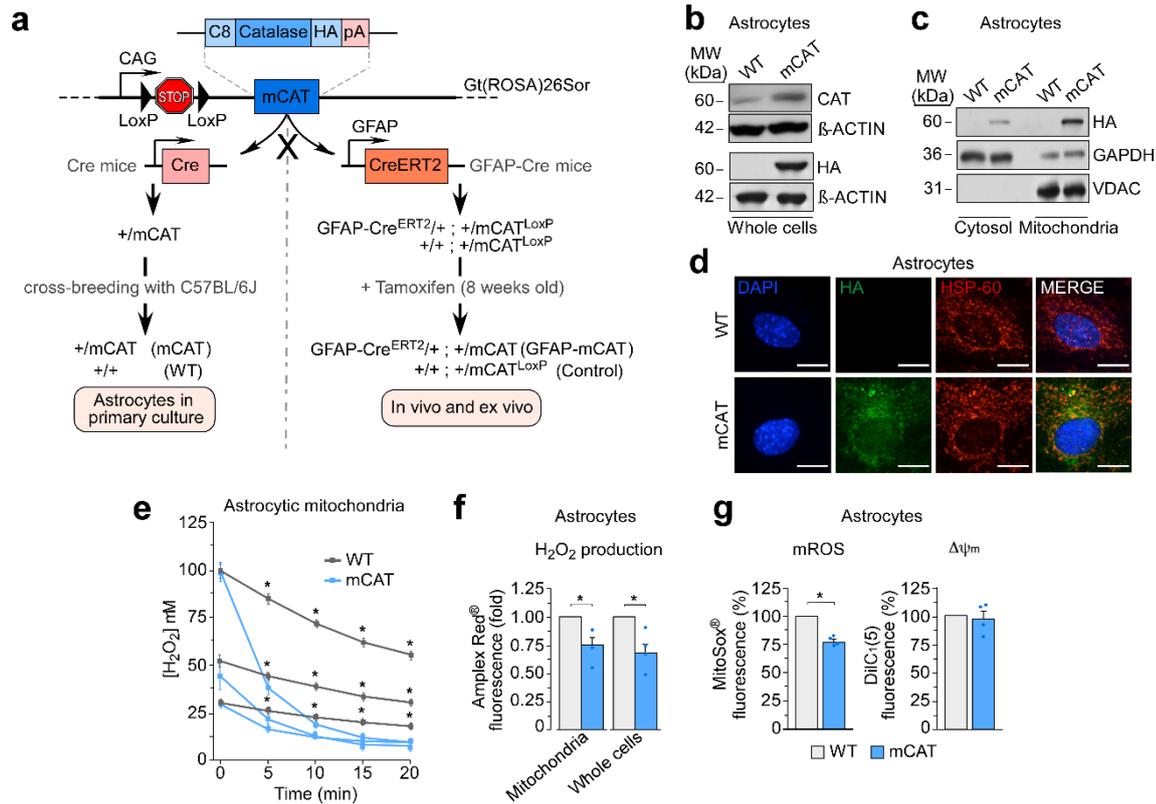


Figure 1. Generation of a conditional and other constitutive mice to study the reduction of mitochondrial ROS (mitoCatalase or mCAT). Characterization of cortical astrocytes in primary culture obtained from the mCAT constitutive mouse. (a) Schematic representation of the strategy used to generate mice expressing a mitochondrial-tagged form of catalase, either constitutively (mCAT) or in astrocytes (GFAP-mCAT), and their respective wild type (WT) or control littermates. C8, cytochrome c oxidase subunit VIII-mitochondrial leading sequence; HA, human influenza hemagglutinin; CAG, ubiquitous CAG promoter; STOP, transcriptional STOP signal; GFAP, glial-fibrillary acidic protein promoter; CreERT2, estrogen receptor T2 (tamoxifen)-dependent Cre recombinase. Tamoxifen was administered intraperitoneally (2 mg/25 g of body weight) for 5 consecutive days. (b) Occurrence of mitochondrial-tagged catalase in astrocytes in primary culture obtained from mCAT mice, as judged by western blotting. (c) Mitochondrial-tagged catalase is expressed in isolated mitochondria from astrocytes in primary culture obtained from mCAT mice, as judged by western blotting. (d) Immunofluorescence imaging shows co-localization of mitochondrial-tagged catalase with mitochondrial marker in astrocytes in primary culture obtained from mCAT mice. Scale bars, 25 μ m. (e) Isolated mitochondria from astrocytes in primary culture obtained from mCAT mice detoxify exogenously-added H_2O_2 more efficiently than the control cells. Data are mean \pm s.e.m. * p <0.05 versus WT (n=3 independent experiments; Student's t test). (f) Astrocytes in primary culture obtained from mCAT mice decreases endogenously-produced H_2O_2 , as determined both in isolated mitochondria and in whole cells. Data are mean \pm s.e.m. * p <0.05 (n=3; Student's t test). (g) Astrocytes in primary culture obtained from mCAT mice decreases endogenous mitochondrial ROS whilst the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) remained unchanged, as analysed by flow cytometry. Data are mean \pm s.e.m. * p <0.05 (n=4; Student's t test).

Figure 2

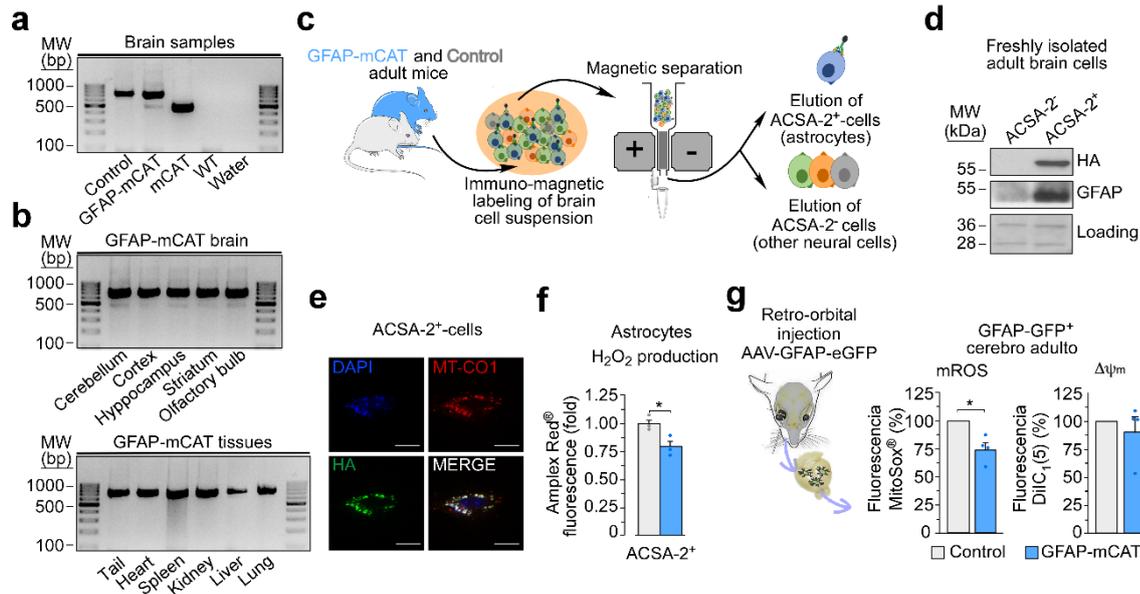


Figure 2. Characterization of the reduction of mitochondrial ROS in astrocytes in GFAP-mCAT mouse *in vivo*. (a) Characterization of recombination event of the inducible mitoCatalase (mCAT) construction in GFAP-mCAT (*GFAP-Cre^{ERT2}/+*; *mCAT/+*) and Control littermates (*+/+*; *mCAT/+*) mice injected with tamoxifen. Results of the PCR showing the bands corresponding to the brain of the GFAP-mCAT and mCAT mice (729 bp and 474 bp identifying not recombined and recombined mCAT bands, respectively). Constitutive mCAT (474 bp) and *wild type* (WT) (no band) animals were used as positive and negative controls, respectively. (b) Results of the PCR showing the amplification of recombined mCAT bands (474 bp) in different brain areas of the GFAP-mCAT mouse (top panel) but not in peripheral tissues (bottom panel). (c) Schematic representation of the commercial immunomagnetic approach used to acutely separate astrocytes (ACSA-2⁺ cells) from other neural cells (ACSA-2⁻) from the adult GFAP-mCAT or control mice brain. (d) *Ex vivo* analysis of mitochondrial-tagged catalase expression in astrocytes by western blotting (anti-HA and anti-GFAP) and (e) co-localization with mitochondria by immunostaining (anti-HA and anti-mt-CO1; scale bars, 18 μm), as assessed in the acutely isolated ACSA-2⁺ and ACSA-2⁻ cell fractions. (n = 2 mice). (f) *Ex vivo* analysis of H₂O₂ production in the acutely isolated ACSA-2⁺ cells. Absolute data in control ACSA-2⁺ cells, 1.7 pmol h⁻¹ μg protein⁻¹. Data are mean ± s.e.m. *P < 0.05 (n = 3 biologically independent samples; Student's t test, two sided). (g) Cells acutely dissociated from the GFAP-mCAT mouse brain, three weeks after intravenous infection with AAVs expressing GFP under the control of the short GFAP promoter (AAV-PHP.eB-gfa-ABC1D-eGFP), showed decreased endogenous mitochondrial ROS whilst the mitochondrial membrane potential (Δψ_m) remained unchanged, as analysed by flow cytometry. Data are mean ± s.e.m. *p < 0.05 (n=4; Student's t test).

Figure 3

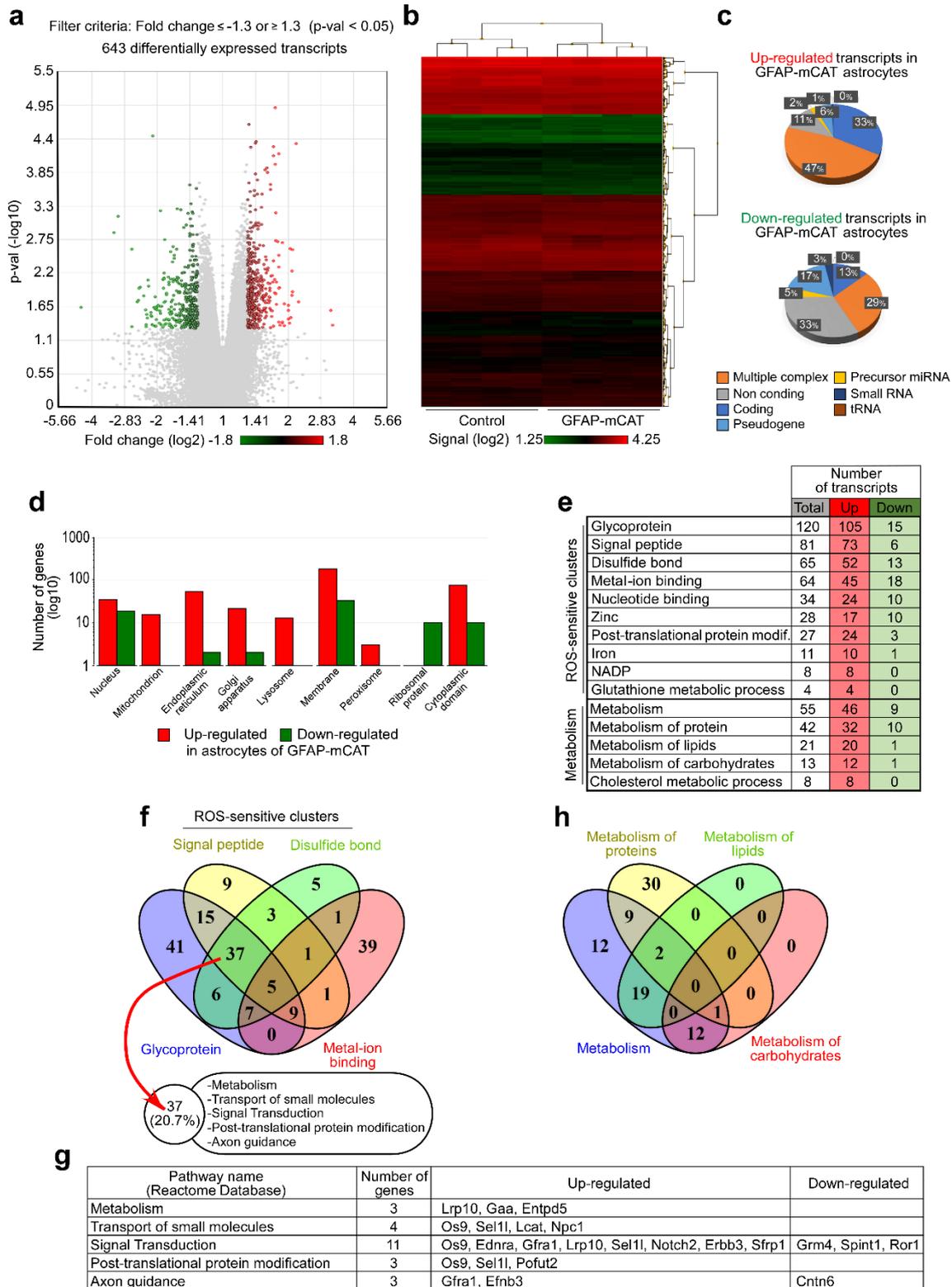


Figure 3. Transcriptomics analysis of freshly isolated astrocytes from the adult GFAP-mCAT mice. (a) Total RNA was purified from astrocytes acutely isolated from the brains of adult GFAP-mCAT and control mice by the immunomagnetic approach, and subjected to a whole-genome transcriptomics array analysis, which revealed a total of 643 transcripts showing statistically significant differential expression levels between GFAP-mCAT and controls, as shown in the volcano plot (setup at p -values < 0.05 and 1.3-fold change), of which 580 genes were functionally annotated and systematically analysed according to the Database for Annotation, Visualization and

Integrated Discovery (DAVID) bioinformatic resource. Volcano plot of significantly ($p < 0.05$) changed (at least 1.3-fold) transcripts showing 643 transcripts statistically different between GFAP-mCAT and control astrocytes ($n=4$ mice per condition). Summarization Method: Gene + Exon - SST-RMA with Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0 (Thermo Fisher Scientific). **(b)** Color scale heatmap in log base 2 and hierarchical clustering dendrogram shows a wide range of expression levels across the transcripts with statistically significant differential expression, and a preference for the highly expressed transcripts in the GFAP-mCAT astrocytes (in red). **(c)** Pie chart illustrating that the vast majority of differentially expressed genes were of the multiple complex and coding (up-regulated genes) or non-coding (down-modulated genes) groups. **(d)** Analysis of the subcellular localization of the altered transcripts in the GFAP-mCAT astrocytes reveals up-regulated genes encoding proteins located in mitochondrion, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lysosome and peroxisome, and no preference for genes encoding nuclear, membrane or cytoplasmic proteins; genes coding for ribosomal proteins were mainly down-modulated in the GFAP-mCAT mice. **(e)** Functionally-related gene groups filtered according to their relevance, as judged by the analysis performed with the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) and the Integrated Molecular Pathway Level Analysis (IMPALA) tools. Results showed two main groups, namely ROS-sensitive and metabolism groups. **(f)** Venn diagram of the ROS-sensitive group showed a set of 37 transcripts having the common term signal peptide, disulfide bond and glycoprotein. Enrichment analysis of these using the IMPALA tool highlighted genes involved in metabolism, transport of small molecules, signal transduction, post-translational protein modification and axon guidance. **(g)** Simplified results from the enrichment analysis and functional annotation using the IMPALA bioinformatics tool on the 37 genes showing the common annotation terms signal peptide, disulfide bond and glycoprotein. Up- and down-regulated refers to the GFAP-mCAT genotype *versus* the control genotype. Gene names are indicated according to the *RefSeq* gene symbol nomenclature. **(h)** Venn diagram of the metabolism group revealing that all genes coding for metabolism of carbohydrates and lipids belong to the metabolism cluster.

Figure 4

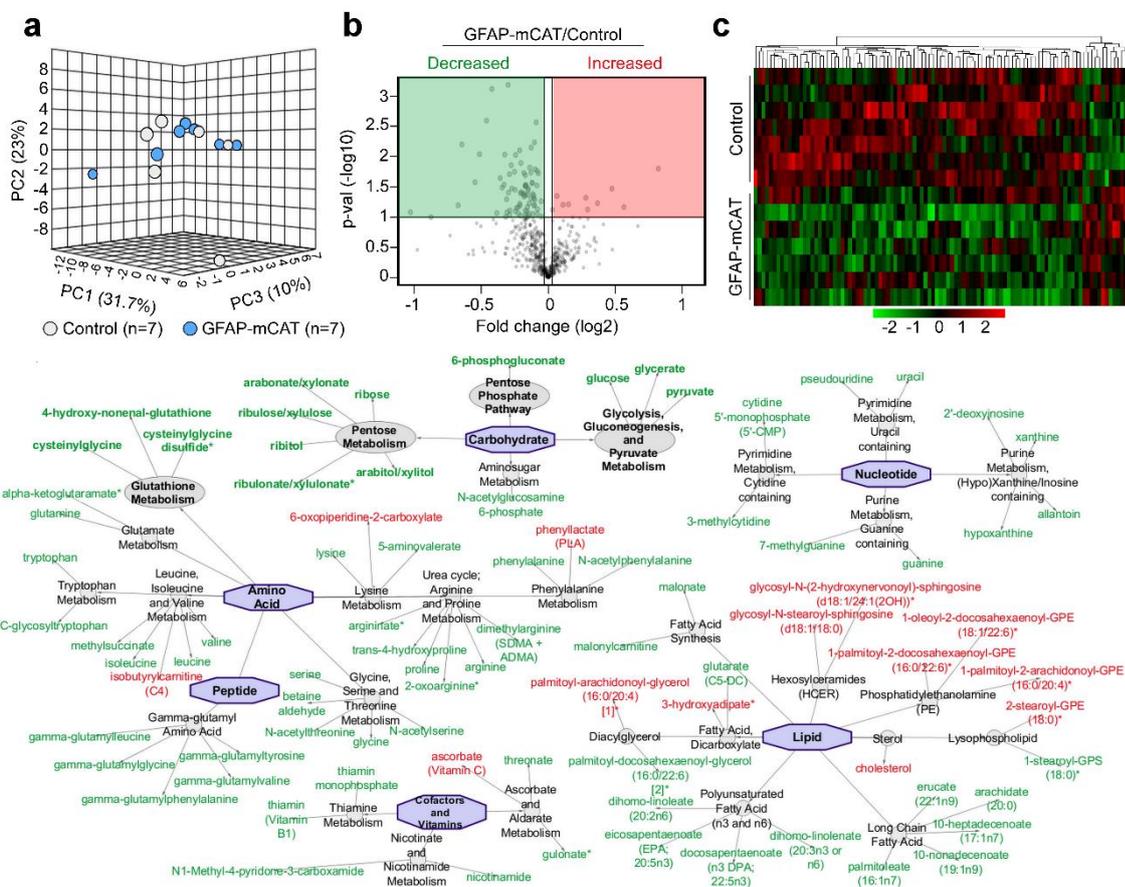


Figure 4. Metabolomics analysis of the brains from the adult GFAP-mCAT mice. (a) Principal component analysis (PCA) of brain metabolites suggests only mild differences between GFAP-mCAT and control groups (n=7 male mice per condition), likely because this metabolomics study was performed in whole brain extracts, although only one neural cell type, i.e., the astrocyte, was genetically altered. (b) Volcano plot indicating the distribution of decreased and increased metabolites in the brain of GFAP-mCAT compared with control mice expressed in fold change. Dots represent the fold change for each of the 540 detected metabolites in this study. The highlighted areas include 53 metabolites (4 increased, 49 decreased) significantly altered ($p < 0.05$) and 40 metabolites (8 increased, 32 decreased) that approached the statistical significance ($0.05 < p < 0.10$) in the brain of GFAP-mCAT compared with control mice. (c) Heatmap of the top 100 metabolites with statistically significant differences ranked by t-test (two-sided, normalized concentration values data, clustering algorithm: average, distance measure: euclidean). (d) Simplified networks analysis using the Cytoscape tool revealed significantly altered metabolites in the brain of the GFAP-mCAT mice in the metabolic pathways related to amino acids, nucleotides, lipids, carbohydrates and cofactors/vitamins, in good agreement with the transcriptomic analysis. Metabolites in green color denote decreased in the GFAP-mCAT mice; metabolites in red color denote increased in the GFAP-mCAT mice.

Figure 5

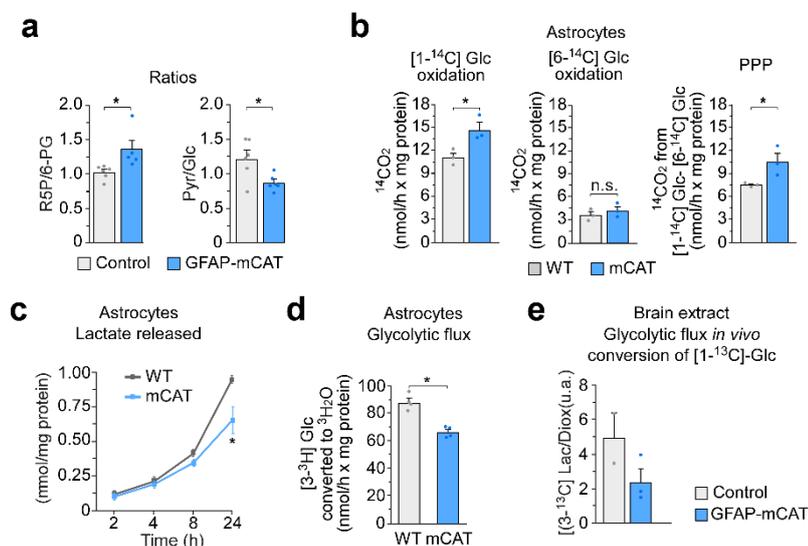


Figure 5. The pentose-phosphate pathway (PPP) is increased and glycolysis is decreased in astrocytes from mCAT mice. (a) Ratios of the concentrations found in the metabolomics analysis for ribose-5-phosphate (R5P), 6-phosphogluconate (6PG), pyruvate (Pyr) and glucose (Glc) in the GFAP-mCAT and control groups, indicates increased R5P/6PG and decreased Pyr/Glc ratios, likely indicating increased pentose-phosphate pathway (PPP) and decreased glycolysis. Data are mean \pm s.e.m. * $p < 0.05$ (n=6 biologically independent samples per condition; Student's t test, two-sided). (b) Rates of ¹⁴CO₂ production from [1-¹⁴C]-glucose (left) and [6-¹⁴C]-glucose (middle) in WT and mCAT astrocytes. Right, difference between the rates of ¹⁴CO₂ production from [1-¹⁴C]- and [6-¹⁴C]-glucose, reflecting the rate of glucose oxidation via the PPP. Data are mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$ (n = 3 biologically independent samples; Student's t test, two sided). n.s., not significant. (c) Lactate release is decreased in mCAT compared with WT astrocytes. * $P < 0.05$ versus WT (n = 3 biologically independent samples; Student's t test, two sided). Absolute values of the mean in μ mol h⁻¹ mg protein⁻¹ for WT/mCAT, respectively, are 0.122/0.102 (2 h), 0.213/0.192 (4 h), 0.416/0.347 (8 h) and 0.963/0.652 (24 h). Data are mean \pm s.e.m. (d) Conversion of [3-³H]-glucose into ³H₂O, reflecting the glycolytic rate, is lower in mCAT than WT astrocytes. Data are mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$ (n = 4 biologically independent samples; Student's t test, two sided). (e) Conversion of [1-¹³C]-glucose into [3-¹³C]-lactate, reflecting the glycolytic rate *in vivo*, detected by nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR), was lower in brain extracts of GFAP-mCAT than control mice. Data are mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$ (n = 3 for GFAP-mCAT and 2 for the control biologically independent samples, each sample was derived from 2 different animals of the same genotype).

Figure 6

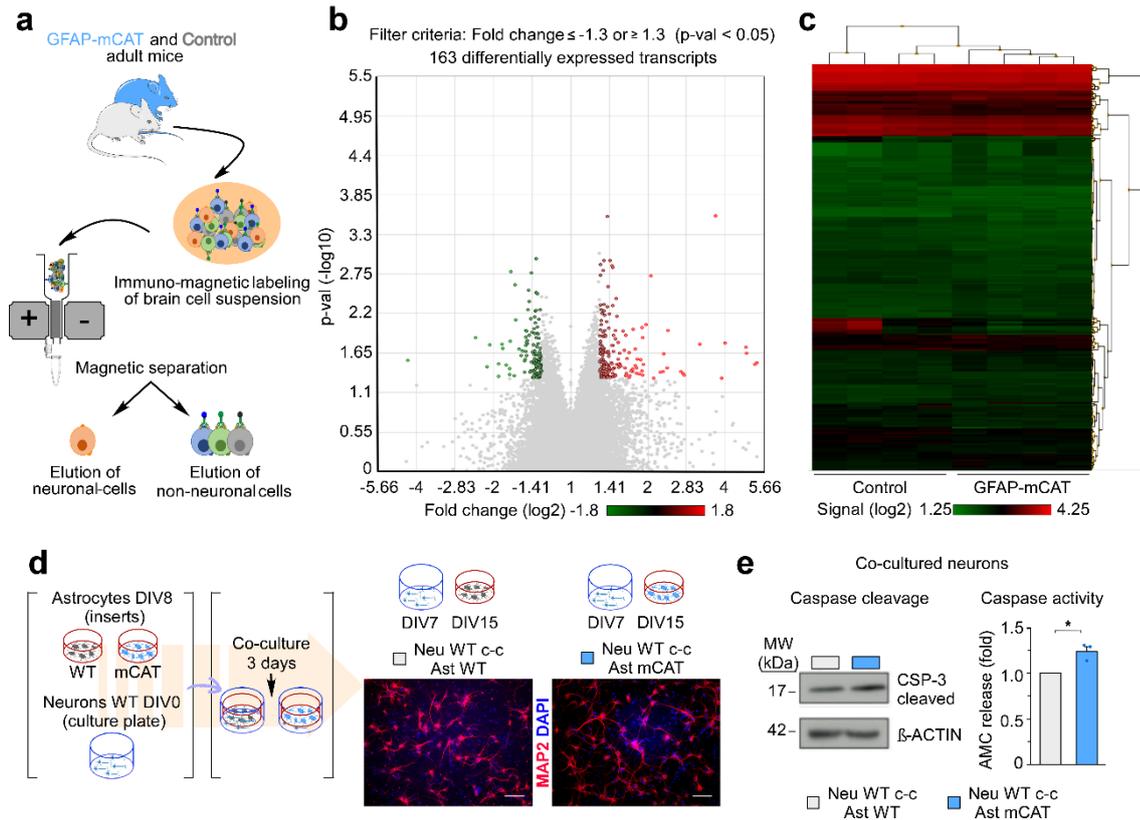


Figure 6. The reduction of astrocytic mROS *in vivo* do not significantly affect gene expression in neurons but leads to neuronal damage *in vitro*. (a) Schematic representation of the commercial immunomagnetic approach used to acutely separate neurons from non-neuronal cells from the adult GFAP-mCAT or control mice brain. (b) Volcano plot of significantly ($p < 0.05$) changed (at least 1.3-fold) transcripts revealed 163 transcripts statistically different between GFAP-mCAT and control neurons ($n = 4$ male mice per condition). Summarization Method: Gene + Exon - SST-RMA with Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0 (Thermo Fisher Scientific). (c) Color scale heatmap in log base 2 and hierarchical clustering dendrogram shows that the majority of genes with statistically significant differences present low levels of expression (in green) in both genotypes. (d) Schematic representation of the strategy for mCAT astrocytes–WT neuron co-culture and immunocytochemistry (MAP2) images of the structure of co-cultured neurons with WT or mCAT astrocytes at the end of the experiment. (d) *Left panel:* Immunoblot showed that, under basal conditions, coculture of neurons with mROS-weakened astrocytes increases the abundance of the active fragment of CSP-3. β -Actin was used as loading control. *Right panel:* Incubation of neurons with mCAT astrocytes for four days shows a ~ 0.5 -fold higher CSP-3 activation compared to neurons co-cultured with WT astrocytes under basal conditions.

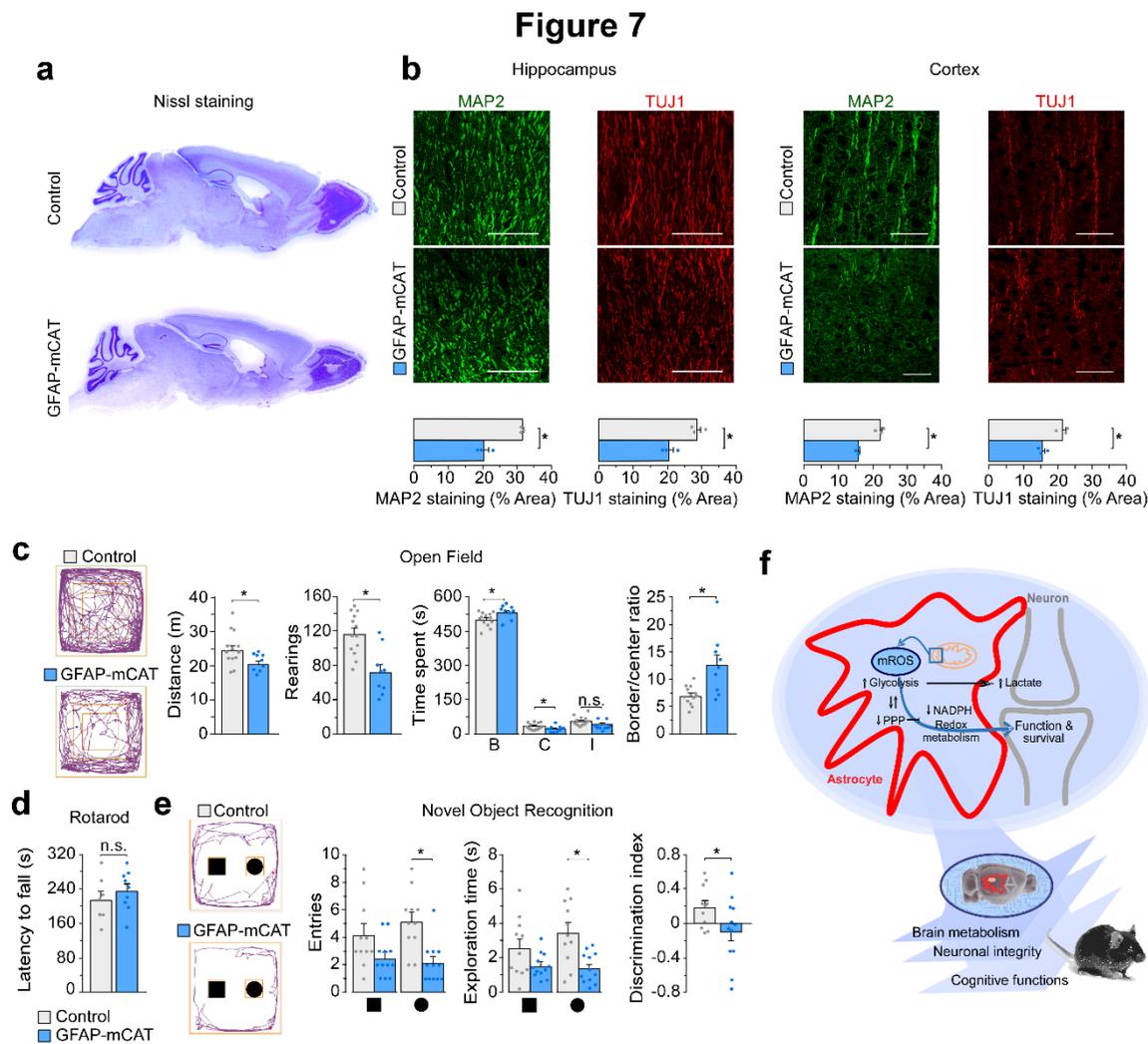


Figure 7. Decreased mitochondrial ROS in astrocytes *in vivo* shows signs compatible with alteration of neuronal structural integrity and causes cognitive impairment in mice. (a) Analysis of brain sections by Nissl staining obtained from the GFAP-mCAT mice revealed no major anatomical alterations in the brain structures ($n = 3$ mice per genotype). (b) Analysis of brain sections by MAP2 and TUJ1 expression, obtained from the GFAP-mCAT mice, revealed signs compatible with dendrite alterations in neurons of the CA1 layer of the hippocampus and parietal cortex. Data are mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$ ($n = 3$ male mice per genotype; Student's *t* test, two sided). Scale bars, $50 \mu\text{m}$. (c) Behavioural analysis in the open field of the GFAP-mCAT mice showed decreased total distance travelled, number of rears and time spent in the central areas (B, border; C, centre; I, intermediate), as well as a significant increase in the ratio of the time spent in the periphery versus the time spent in the centre areas. Data are mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$ ($n = 13$ control male mice; $n = 9$ GFAP-mCAT male mice; Student's *t* test, two sided). (d) Motor coordination was unaffected in the GFAP-mCAT mice according to the rotarod test. Data are mean \pm s.e.m. n.s., not significant ($n = 7$ control male mice; $n = 9$ GFAP-mCAT male mice; Student's *t* test, two sided). (e) The number of entries and the exploring time spent with the novel object (sphere) were significantly different between the GFAP-mCAT mice and control mice; the discrimination index was significantly lower in the GFAP-mCAT mice than the control mice. Data are mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$ ($n = 11$ control male mice; $n = 12$ GFAP-mCAT male mice; Student's *t* test, two sided). (f) Visual summary of the proposed overall mechanism of this study.

DISCUSSION

In summary, here we describe that astrocyte-specific down modulation of endogenous mitochondrial ROS *in vivo* causes profound changes in brain energy and redox metabolism eventually leading to loss of neuronal integrity and cognitive impairment (Vicente-Gutierrez et al. 2019) (**Figure 7f**). Using this strategy, we obtained a relatively modest (~25-30%) decrease in astrocytic mROS, suggesting that only the most sensitive targets were identified. The analysis of the transcriptomics and metabolomics data identified several metabolic pathways affected in the brain by mROS reduction in astrocytes, which can account for the highlighted *in vivo* neuronal dysfunction. The apparently diverse molecular targets and metabolic pathways affected by the decreased mROS is likely a consequence of potential regulation for H₂O₂ -mediated signaling (Sies 2014a; Toledano et al. 2010; Young et al. 2019). However, we focused mainly on glucose metabolism mainly glycolysis and pentose phosphate pathway (PPP). According to our data, in astrocytes, physiologic mROS are necessary to maintain their high glycolytic flux which is essential to ensure neuronal lactate-dependent metabolic support (Trevisiol and Nave 2015). But also given its substantial activation after mROS downmodulation, astrocytic mROS levels may down modulate PPP activity and its crucial role in controlling redox balance and glucose metabolism in several paradigms (Bolaños 2016; Dunn et al. 2014; Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009). Moreover, transcriptomics and metabolomics data suggest that glucose metabolism is not the only target of astrocytic mROS signaling which broadens the range of study to new mechanisms that require in-depth studies. Whether these molecular mechanisms account for the protection of dendrite stability and cognitive function, which we herein describe *in vivo*, is a likely possibility that would require further *in vivo* studies. However, the astrocyte-neuronal co-culture data showing neuronal damage by astrocyte mROS attenuation strongly supports this notion (Volkenhoff et al. 2015). Nonetheless, we do not disregard the possibility that, besides the control of redox balance and lactate support, astrocytic mROS regulates neuronal functions through additional mechanisms, including the supply of other metabolic substrates. This study is therefore first demonstrating specific physiological functions for mROS in astrocytes in behaving mice.

The brain is an exceptionally vulnerable tissue to redox stress (Cobley et al. 2018). Accordingly, antioxidant compounds administration has shown protection in pre-clinical models of neurological conditions closely associated with redox stress (Kamat et al. 2008; Neves Carvalho et al. 2017). Unfortunately, translation of this knowledge into clinical trials have failed so far (Halliwell 2013; Heyland et al. 2013; Kamat et al. 2008), thus challenging the general notion that ROS are deleterious species. In fact, our data identifying a physiological brain protective function for astrocytic high mROS helps to understanding such a failure of the antioxidant therapy. Moreover, a certain level of redox stress during early life in mice associates with protection against overall damage in aging (Latorre-Pellicer et al. 2016). In sum, an increasing body of evidence now suggests that ROS exert physiological functions in several tissues (Sena and Chandel 2012); however, the potential physiological roles for mROS in the brain had not been so far addressed. Our data suggest that caution should be taken when studying the (patho)physiological roles of mROS in the brain, since naturally occurring high mROS abundance in astrocytes coexists with low mROS in neurons (Lopez-Fabuel et al. 2016). Antioxidants administration, at least under healthy conditions, may therefore hamper the beneficial effects of astrocytic mROS for the normal brain function.

CONCLUSIONS

At the light of the results presented in this summary of the doctoral thesis entitled astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour, we have obtained the following conclusions:

1. We have generated a mice model that allows the functional expression of a mitochondrial-tagged isoform of catalase (mitoCatalase or mCAT).
2. Using this strategy, we showed that it is possible to obtain a significant reduction in the production of endogenous mitochondrial reactive oxygen species (mROS) in astrocytes *in vitro* and *in vivo*.
3. In astrocytes, astrocytic mROS physiologically regulates glucose metabolism by promoting glycolysis and repressing pentose phosphate pathway (PPP).
4. In neurons, astrocytic mROS control neuronal survival by regulating bioenergetics and redox metabolism.
5. *In vivo* the reduction of mROS specifically in astrocytes perturbs neuronal integrity, as judged by neuron structure analysis, and causes cognitive impairment in mice.

MATERIALS AND METHODS

mCAT and GFAP-mCAT mice. All animal procedures we performed according to the European Union Directive 86/609/EEC and Recommendation 2007/526/EC, regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, enforced in Spanish legislation under the directive RD1201/2005. All protocols were approved by Bioethics Committee of the University of Salamanca. A transgenic mouse harboring the full-length cDNA of catalase fused to the cytochrome c oxidase subunit VIII-mitochondrial leading sequence, and to the human influenza hemagglutinin (HA) for tagging purposes (mitochondrial-tagged catalase) was generated by homologous recombination in the *Rosa26* locus under a C57BL/6J background upon request by genOway (Lyon, France). A floxed transcriptional STOP cassette was incorporated between the mitochondrial-tagged catalase cDNA and the CAG promoter (mCAT^{LoxP}/+), in order to eventually obtain tissue- and time-specific expression of mitochondrial-tagged catalase *in vivo*. mCAT^{LoxP}/+ mice, bred under a C57BL/6J background, was mated with CMV-Cre recombinase (CMV-Cre/+ or Cre delete) mice to remove the STOP cassette to constitutively express mitochondrial-tagged catalase (mCAT/+ or mCAT mice). Heterozygous constitutive mCAT mice was backcrossed with C57BL/6J mice to perform *in vitro* experiments with mCAT and wild-type (+/+ or WT) littermates. To express mCAT in astrocytes *in vivo*, mCAT^{LoxP}/+ mice was mated with mice harboring the estrogen receptor (ERT2)-inducible (tamoxifen-dependent) Cre recombinase (Cre^{ERT2}) governed by the astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter (GFAP-Cre^{ERT2}/+)(Hirrlinger et al. 2006). The progeny, namely GFAP-Cre^{ERT2}/+; mCAT^{LoxP}/+, and +/+; mCAT^{LoxP}/+ littermates, at the age of two months, were intraperitoneally injected with 100 µl of a 20 mg/ml stock tamoxifen solution in a mixture of sunflower oil and ethanol (9:1, by volume) for five consecutive days in order to activate Cre recombinase activity in astrocytes *in vivo*. The resulting mice, namely GFAP-Cre^{ERT2}/+; mCAT/+ (henceforth GFAP-mCAT) and +/+; mCAT^{LoxP}/+ littermates (henceforth Control) were used as from the age of 8 months. Animals were bred at the Animal Experimentation Facility of the University of Salamanca in cages (maximum 5 animals/cage), and a light-dark cycle was maintained for 12 hours. Humidity was 45-65% and temperature 20-25°C. Animals were fed ad libitum with a standard solid diet (17% proteins, 3% lipids, 58.7% carbohydrates component, 4.3% cellulose, 5% minerals and 12% humidity) and free access to water.

Genotyping by polymerase-chain reaction (PCR). The primer sequences for genotyping the mCAT allele were following three: 5'-CTCCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATCA-3', 5'-CGATTTGTGGTGTATGTAATACTGTCTGG-3' and 5'-GCAGTGAGAAGAGTACCACCATGAGTCC-3', which yielded a 778 bp band for the wild type allele and a 245 bp band for the mCAT allele. To enable distinguishing the non-excised recombined inducible allele containing the transcriptional STOP cassette from the Cre-mediated excised allele devoid of the transcriptional STOP cassette, we performed PCR using the following primers; primer 1, 5'-GAGCCATCTCATCAGTAAAACTACGTCCTG-3', primer 2, 5'-AGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCC-3', and primer 3, 5'-CTTACTCCACACAGGCATAGAGTGTCTGC-3', which yielded no amplification product in the wild type allele, a ~729 bp band in the non-recombined mCAT allele, and a ~474 bp band in the recombined mCAT allele. C57BL/6J mice have recently been differentiated from other C57BL/6 strains tested by a null allele encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) on Chr. 13. The Nnt allele was PCR genotyped using a three primer, two allele PCR assay that discriminates between the Nnt wild-type allele and the mutant allele lacking exons 7- 11 inclusive found in B6/J mice. The primer sequences are Nnt-COM 5'-GTAGGGCCAACTGTTTCTGCATGA-3', Nnt-WT 5'-GGGCATAGGAAGCAAATACCAAGTTG-3' and Nnt-MUT 5'-GTGGAATTCCGCTGAGAGAACTCTT-3'. The amplification products are 579 bp for the wild type allele and 743 bp for the mutant allele(Nicholson et al. 2010).

Primary cell cultures and co-cultures. Astrocytes in primary culture were obtained from 0-24 h old mCAT or littermate WT mouse neonates(D Jimenez-Blasco et al. 2015). Cell suspension were seeded in 75 cm² plastic flasks in low glucose (5.5 mM) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum. To detach non-astrocytic cells, after one week *in vitro*, the flasks were shaken at

180 r.p.m. overnight. The supernatant was discarded, and the attached, astrocyte-enriched cells were pooled according to their genotype and reseeded at 0.5×10^5 cells/cm² in different size plates. At day 11 *in vitro* the medium was replaced with Neurobasal® A medium supplemented with 2 mM glutamine, 5.5 mM glucose, 0.22 mM pyruvate and 2% of the minus antioxidant (MAO; i.e., lacking vitamin E, vitamin E acetate, superoxide dismutase, catalase and glutathione) B27 supplement (Life Technologies). Glucose concentrations were monitored every day as from day 13 *in vitro* using a validated glucometer (Glucocard G+ meter, A. Menarini diagnostics) and adjusted to 5.5 mM from a 1 M glucose stock solution. Astrocytes were used for experiments on day 15 *in vitro*. Primary cultures of mice cortical neurons were prepared from E15.5 days WT mouse, seeded at 2.0×10^5 cells/cm² in different size plastic plates coated with poly-D-lysine (10 µg/ml) and incubated in Neurobasal A supplemented with 2 mM glutamine, 5.5 mM glucose, 0.22 mM pyruvate and 2% B27 MAO supplement. Cells were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂-containing atmosphere. At 72 hours after plating, medium was renewed, and cells used at day 7. To obtain astrocyte-neuronal co-cultures, astrocytes at 8 days *in vitro* were re-seeded on semipermeable polyester Transwell® membrane inserts (0.4 µm pore size, Corning) and, at day 11 *in vitro*, astrocyte-containing inserts were placed over 3 days *in vitro* neurons and co-cultured in Neurobasal® A supplemented with 2 mM glutamine, 5.5 mM glucose, 0.22 mM pyruvate and 2% B27 MAO supplement for 4 more days.

Mitochondria isolation. Mitochondria were obtained according to a previously published protocol (Acín-Pérez et al. 2008a). Briefly, cells (12-100 millions) were collected, cell pellets frozen at -80 °C and homogenized (10 strokes) in a glass-teflon Potter-Elvehjem homogenizer in Buffer A (sucrose 83 mM; MOPS 10 mM; pH 7.2). The same volume of Buffer B (sucrose 250 mM; MOPS 30 mM) was added to the sample, and the homogenate was centrifuged (1,000 x g, 5 min) to remove unbroken cells and nuclei. Centrifugation of the supernatant was then performed (12000 x g, 2 min) to obtain the mitochondrial fraction, which was washed in Buffer C (sucrose 320 mM; EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM; pH 7.4). Mitochondria were suspended in Buffer D (6-aminohexanoic acid 1M; Bis-Tris-HCl 50 mM; pH 7.0).

Mitochondrial catalase activity determination. This was measured in isolated mitochondria according to a previously published protocol based on the ability of catalase to eliminate exogenous H₂O₂. Mitochondrial samples (5 µg of protein) were incubated, in a final volume of 50 µl of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, with 25, 50 and 100 µM H₂O₂ for 0, 5, 10, 15 and 20 minutes. Reactions were stopped by adding HCl (37% final concentration, vol/vol). Afterwards, 3.2 mM (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ and 180 mM KSCN were added and the samples incubated for 10 min at room temperature in the dark. The absorbance at 492 nm was measured using a Varioskan® Flash (Thermo Fisher) and the concentration of the residual H₂O₂ was calculated using a standard curve.

Mitochondrial ROS. Mitochondrial ROS was determined using the fluorescent probe MitoSox™ (Life Technologies). Cells, astrocytes in primary culture or adult brain cell suspensions, were incubated, respectively, with 2 or 3 µM of MitoSox™ for 30 min at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in HBSS buffer (NaCl 134.2 mM; KCl 5.26 mM; KH₂PO₄ 0.43 mM; NaHCO₃ 4.09 mM; Na₂HPO₄·2H₂O 0.33 mM; glucose 5.44 mM; HEPES 20 mM; CaCl₂·2H₂O 4 mM; pH 7.4). Cells were then washed with PBS (phosphate-buffered saline, 0.1 M) and, in the case of cultured cells, collected by trypsinization. MitoSox™ fluorescence intensity was assessed by flow cytometry (FACScalibur flow cytometer, BD Biosciences) and expressed in arbitrary units.

H₂O₂ determination. For H₂O₂ assessments, Amplex™ Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Life Technologies) was used. Cultured astrocytes or ACSA-2+ cells were reseeded onto 96 well plates at day 8 in culture. On day 15, attached astrocytes were washed with PBS and incubated in KRPG buffer (NaCl 145 mM; Na₂HPO₄ 5.7 mM; KCl 4.86 mM; CaCl₂ 0.54 mM; MgSO₄ 1.22 mM; glucose 5.5 mM; pH 7.35) in the presence of 9.45 µM Amplex™ Red containing 0.1 U/ml of horseradish peroxidase. Luminescence was recorded for 2 hours at 30 min intervals using a Varioskan® Flash (Thermo Scientific) (λ_{exc} = 538 nm; λ_{em} = 604 nm). Slopes were used for the calculations of the rates of H₂O₂ formation, and the results were expressed as fold change.

Active caspase-3 determination. This assay was used to estimate apoptosis. A fluorimetric caspase 3 assay kit (Sigma-Aldrich) was used following the manufacturer's protocol. This assay is based on the hydrolysis of the peptide substrate Ac-DEVD-AMC (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin) by caspase-3, which results in the release of fluorescent 7-amino-4-methylcoumarin (AMC). In brief, cells were lysed with 50 mM HEPES, 5 mM CHAPS, 5 mM DTT, pH 7.4 for 20 min on ice, and the assay buffer containing the Ac-DEVD-AMC substrate (20 mM HEPES, 2 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 5 mM DTT, 16 μ M Ac-DEVD-AMC, pH 7.4) was added. Aliquots of 200 μ l were transferred to a 96-wells plate and the fluorescence recorded for 2 hours at 20 min intervals at 37 °C (λ_{exc} =360 nm, λ_{em} =460 nm). CSP-3 activity was determined as AMC release rate extrapolating the slopes to those obtained from an AMC standard curve. Results were expressed as fold change, arbitrarily assigning the value of 1 to control cells.

Determination of PPP and glycolytic fluxes. These were measured in 8 cm² flasks of adherent cells at 60-70% confluence containing a central microcentrifuge tube with either 0.8 ml benzethonium hydroxide (Sigma) for ¹⁴CO₂ equilibration or 1 ml H₂O for ³H₂O equilibration. Incubations were carried out in KRPG containing 5 mM D-glucose at 37°C in the air-thermostatized chamber of an orbital shaker (Forma Benchtop Orbital Shaker, Model 420, Thermo Fischer). In order to ensure adequate oxygen supply for oxidative metabolism throughout the incubation period, flasks were filled with oxygen before being sealed. To measure the carbon flux from glucose through the PPP, cells were incubated in KRPG (5 mM D-glucose) buffer supplemented with 0.5 μ Ci D-[1-¹⁴C]glucose or [6-¹⁴C]glucose for 90 min as previously described (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009; Rodriguez-Rodriguez et al. 2013). Incubations were then terminated by the addition of 0.2 ml 20% perchloric acid (Merck Millipore) for 40 min before the benzethonium hydroxide (containing ¹⁴CO₂) was removed and the radioactivity measured with a liquid Scintillation Analyzer (Tri-Carb 4810 TR, PerkinElmer). PPP flux was calculated as the difference between ¹⁴CO₂ production from [1-¹⁴C]glucose (which decarboxylates through the 6-phosphogluconate dehydrogenase-catalyzed reaction) and that of [6-¹⁴C]glucose (which decarboxylates through the tricarboxylic acid cycle) (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009; Larrabee 1990). Glycolytic flux was measured by assaying the rate of ³H₂O production from [3-³H]glucose using a similar method but instead incubating cells with 5 μ Ci D-[3-³H]glucose in KRPG buffer per flask for 120 minutes as previously described (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009; Rodriguez-Rodriguez et al. 2013). Incubations were then terminated with 0.2 ml 20% perchloric acid, and cells further incubated for 96 hours with a microcentrifuge tube, containing H₂O, suspended above the cells to allow ³H₂O equilibration. The ³H₂O was then measured by liquid scintillation counting (Tri-Carb 4810 TR, PerkinElmer). Under these experimental conditions, 75% of the produced ¹⁴CO₂ or 28% of the produced ³H₂O were recovered, which were used for the calculations as previously established (Rodriguez-Rodriguez et al. 2013).

Lactate determination. Lactate concentrations were measured in the culture medium spectrophotometrically (Herrero-Mendez, Almeida, Fernández, Maestre, Moncada, and Juan P Bolaños 2009) by determining the increments in absorbance of the samples at 340 nm in a mixture containing 1 mM NAD⁺ and 22.5 U/ml lactate dehydrogenase in 0.25 M glycine/0.5 M hydrazine/1 mM EDTA buffer at pH 9.5.

¹³C-NMR glycolytic flux assessment *in vivo*. This experiment was performed in collaboration with Sebastian Cerdan laboratory. control and GFAP-mCAT mice were injected with a single intraperitoneal bolus of [1-¹³C]-glucose and after 15 min animals were sacrificed using a focused microwave irradiation which is essential to assay metabolite concentrations avoiding rapid metabolism during post mortem processes. Then metabolites were measured *ex vivo* in brain extracts by nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR). Levels of [3-¹³C]-lactate derived from *in vivo* consumption of [1-¹³C]-glucose and normalized by 1,4-dioxane standard, reflected the glycolytic flux *in vivo*.

Mitochondrial membrane potential. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was assessed using MitoProbe™ DiIC1(5) (Life Technologies) (50 nM) by flow cytometry (FACScalibur flow cytometer, BD

Biosciences). For this purpose, suspended cells were incubated with the probe at 37°C for 30 min in the presence of PBS. $\Delta\Psi_m$ values were expressed in relative percentages from arbitrary units after subtracting the potential value obtained in the presence of CCCP (10 μ M, 15 min) in each sample.

Intravenous injections of adeno-associated viral vectors (AAVs). We used an AAVs infection approach to distinguish adult astrocytes *in vivo*. To do this, we used the AAV-PHP.eB capsid (Chan et al. 2017) that efficiently transduce the central nervous system following intravenous injection. The AAV express a green fluorescent protein (GFP) driven by the short astrocyte-specific GFAP promoter (gfa-ABC₁D-GFP) (Lee et al. 2008). Both elections, capsid and the promoter, are critical to achieve a good efficiency and accuracy to target the infection to astrocytes. Adult mice (14 months old) were briefly anesthetized with sevoflurane (Sevorane. AbbVie, Spain) at 6% for initiation followed by ~3% for maintenance in air with supplement O₂ and NO₂ (0.4 and 0.8 litres/min, respectively) using a gas distribution column (Hersill H-3, Spain) and a vaporizer (InterMed Penlons Sigma Delta, UK). A 50 μ l aliquot of a PBS solution containing 0.001% Pluronic® F-68 (Sigma-Aldrich) and 5 x 10¹⁰ VG (viral genomes) of AAV-PHP.eB-gfa-ABC₁D-eGFP was administered in the retro-orbital venous sinus. Intravenous vascular access is technically challenging in the adult mouse and this technique is a useful and less failure-prone alternative to tail or temporal veins injection for the administration of non-tumorigenic solutions [Yardeni, 2011, 155]. The total duration of the procedure per mouse was less than 10 min, including anesthesia and recovery. Three weeks after infection, brains were extracted, and a single cell suspension was achieved by trypsinization and smooth mechanical resuspension. The cell suspension was incubated with MitoSox™ and MitoProbe™ DiIC₁(5), as described above, to assess mitochondrial ROS and mitochondrial membrane potential, respectively, in GFP⁺ cells by flow cytometry (FACScalibur flow cytometer, BD Biosciences).

Immunomagnetic purification of neurons and astrocytes from adult brain. Mouse adult brain was dissociated using the adult mouse brain dissociation kit (Miltenyi Biotec). Dissociated cells after removal of debris and red blood cells were separated using either the astrocyte-specific anti-ACSA-2 Microbead Kit or the neuron-specific Neuron Isolation Kit, according to manufacturer's protocol (MACS® technology). We confirmed the identity of the isolated fractions by Western blotting against neuronal (MAP2) or astrocytic (GFAP)-specific markers (Lopez-Fabuel et al. 2016).

Total protein extraction. To obtain total cell protein extracts, cells were washed with cold PBS and lysed in RIPA buffer (1% sodium dodecylsulphate, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 % v/v Triton Tx-100, 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0), supplemented with phosphatase (1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF) and protease (100 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50 μ g/ml aprotinine, 50 μ g/ml leupeptine, 50 μ g/ml pepstatin, 50 μ g/ml anti-papain, 50 μ g/ml amastatin, 50 μ g/ml bestatin and 50 μ g/ml soybean trypsin inhibitor) inhibitor cocktail, and boiled for 5 min. Extracts were then centrifuged at 13.000 x g for 10 min and the supernatant collected for analysis.

Cytosolic and mitochondrial protein fractionation. To obtain cytosolic and mitochondrial fractions from cultured cells, a differential centrifugation protocol was used (Almeida and Medina 1998). Cells grown in 145 cm² plates were collected in Mitochondria Isolation Buffer (MIB, 320 mM sucrose, 1 mM potassium EDTA, 10 mM Tris-HCl and the protease and phosphatase inhibitor cocktail, pH 7.4). Cells were centrifuged at 600 x g for 5 min and the pellet re-suspended in MIB. After 18 stroke homogenization steps in a Teflon pestle attached to a Potter-Elvehjem homogenizer, the homogenate was centrifuged three times at 1.300 x g for 10 min, keeping the supernatants in every step. The mitochondrial pellet resulted from the final centrifugation (at 17.000 x g for 12 min) was re-suspended in RIPA buffer, and the supernatant, containing the cytosolic fraction, was kept on ice.

Primary antibodies for Western blotting and immunocytochemistry. Immunoblotting was performed with anti-GFAP (1/1000) (G9269, Sigma), anti-catalase (1/1000) (PA5-23246, Thermo Scientific), anti-GAPDH (1/40000) (4300, Ambion) anti-HA tag (1/10000) (26183, Thermo Scientific), anti-HA-tag (1/1000) (C29F4, Cell Signaling), anti-VDAC (1/1000) (PC548, Calbiochem), anti-MT-CO1 (1/1000) (ab14705, Abcam) and anti- β -ACTIN (1/30000) (A5441, Sigma).

Western blotting. Cells were lysed in RIPA buffer (1% SDS; 2 mM EDTA; 12.5 mM Na₂HPO₄; 1% triton X-100; 150 mM NaCl; pH 7), supplemented with phosphatase (1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF) and protease (100 μM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50 μg/ml aprotinin, 50 μg/ml leupeptin, 50 μg/ml pepstatin, 50 μg/ml anti-papain, 50 μg/ml amastatin, 50 μg/ml bestatin and 50 μg/ml soybean trypsin inhibitor) inhibitor cocktail, 100 μM phenylmethylsulfonyl fluoride and phosphatase inhibitors (1 mM o-vanadate). Samples were boiled for 5 min. Aliquots of cell lysates (50 μg protein, unless otherwise stated) were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) electrophoresis on an 8 or 10% acrylamide gel (MiniProtean, Bio-Rad) including PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo). The resolved proteins were transferred electrophoretically into nitrocellulose membranes (Amersham protran premium 0.45 nitrocellulose, Amersham). Membranes were blocked with 5% (wt/vol) low-fat milk in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.1% (w/v) Tween 20, pH 7.5, for 1 h. Subsequently, membranes were immunoblotted with primary antibodies overnight at 4°C. After incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnologies), goat anti-mouse IgG (Sigma and BioRad), mouse anti-rabbit IgG (Sigma), or rabbit anti-goat IgG (Abcam) (all at 1/10000 dilution, except goat anti-rabbit and mouse anti-rabbit, which were at 1/4000 and 1/5000, respectively), membranes were immediately incubated with the enhanced chemiluminescence kit WesternBright ECL (Advansta) or SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific™), before exposure to Fuji Medical X-Ray film (Fujifilm), and the autoradiograms scanned. Three to four biologically independent replicates were always performed, though only one representative western blot is shown in the main article. The protein abundances of all western blots per condition were measured by densitometry of the bands on the films using ImageJ 1.48u4 software (National Institutes of Health, USA), were normalized, and the resulting values were used for the statistical analysis (D Jimenez-Blasco et al. 2015).

Immunofluorescence. Astrocytes in culture were grown on glass coverslips, and freshly isolated adult astrocytes (Miltenyi protocol) were seeded in Lab-Tek® Chamber Slide™ system previously treated with poly-D-Lysine and left attaching for 4 days previous the immunocytochemistry protocol. Attached cells were fixed with 4% paraformaldehyde (vol/vol) in PBS for 20 min and washed with PBS. Subsequently, astrocytes were incubated in 5% goat serum, 1% BSA PBS-Tx 0.2% for 1 hour at room temperature. Afterwards, they were incubated with the primary antibody in 2% goat serum, 1% BSA, PBS-Tx 0.2% overnight at 4°C. On the following day, astrocytes were washed with PBS-Tx 0.2% and incubated with the secondary antibody and the nuclear marker DAPI (Sigma, D9542, 1/10,000) in 2% goat serum, 1% BSA, PBS-Tx 0.2% for 1 hour at room temperature. Subsequently, glass coverslips were placed on a glass slide using SlowFade® (Molecular Probes) in order to avoid fluorescence loss. Primary antibodies used were anti-Heat shock protein 60 (HSP60) (1/500) (ab46798, Abcam), anti-HA tag (1/1000) (2367, Cell Signaling) anti-HA-tag (1/1000) (C29F4, Cell Signaling), anti-MT-CO1 (1/1000) (ab14705, Abcam). Secondary antibodies used were Cy2 goat anti-mouse (1/500) (115-225-003), Cy2 goat anti-rabbit (1/500) (111-225-144), Cy3 goat anti-mouse (1/500) (115-165-003) and Cy3 goat anti-rabbit (1/500) (111-165-003) (all from Jackson ImmunoResearch). Confocal microscopy images were obtained using a spinning disk confocal microscopy Olympus IX81 and processed with Adobe Photoshop cs5.5 software and ImageJ.

Transcriptomic microarray. Neurons and astrocytes were acutely dissociated, using the immunomagnetic approaches described as above, from 14 months-old control or GFAP-mCAT mice (n=4 for each condition). Total RNA samples were extracted and purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity and quantity were assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer. Whole-genome expression analysis was carried out using Affymetrix Clariom™ D Array for mouse (Thermo Fisher Scientific). The data were processed by Affymetrix Transcriptome Analysis Console (TAC) Software with default setting of Gene + Exon-SST-RMA summarization method to calculate the expression level for each probeset of the array. The difference in expression was calculated using the median value in log base 2 from each probeset over all the previously normalized chips. TAC was also used to generate heatmaps and volcano plots. A list of probesets/transcripts with a statistically significant differential expression was then generated with the criteria that the fold change was higher than +/- 1.3 and the p-value 0.05 (Limma, eBayes analysis). The generated transcripts sublist were functionally

annotated using the online bioinformatics resources Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID version 6.8(Huang, Brad T Sherman, et al. 2009; Huang, Brad T. Sherman, et al. 2009)) and the Integrated Molecular Pathway Level Analysis (IMPALA version 11), with default settings. The enriched functional-related gene groups were filtered according to their relevance and the selected clusters were referred with the corresponding terms (for example, “metabolism”, “disulfide bond”) extracted from the annotated file and derived from different Database resources including Gene Ontology terms, bio-pathways, protein functional domains and others. Venn diagrams was elaborated with bioinformatics resource Venny 2.1.0(Oliveros n.d.).

Metabolomic analysis. One hemisphere of 14 months-old control or GFAP-mCAT mice (n=7 for each condition) was snap frozen in liquid nitrogen and used for untargeted metabolomic analysis (Metabolon, Morrisville, NC, USA) according to the proprietary methodology to provide a biochemical profiling and statistical analysis associated with compared conditions. The Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectroscopy (UPLC-MS/MS) analysis detected 540 metabolites. Raw data were extracted, peak-identified, QC processed, curated and normalized by Metabolon service. Following log transformation and imputation of missing values, with the minimum observed value for each compound, Welch’s two-sample t-test were used to identify compounds significantly different between experimental groups. Using these filters, we accepted a high estimate of the false discovery rate ($q\text{-value}\leq 0.50$), although other considerations were implemented to determine whether a result merited further scrutiny. Such evidence included (i) significance for another dimension of the study, (ii) inclusion in a common pathway with a highly significant compound, (iii) residing in a similar functional biochemical family with other significant compounds or (iv) correlation with other experimental approaches. Cytoscape 3.6.0 Software was used for visualization and analysis of biological networks. Graphs corresponding to statistical analysis were carried out with the online tool MetaboAnalyst 4.0, and integration with transcriptomics microarray data was performed with the Integrated Molecular Pathway Level Analysis (IMPALA version 11), with default settings. Only pathways with further evidence were highlighted.

Mice perfusion and immunohistochemistry. Male mice (14 months-old) were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of xylazine hydrochloride (Rompun; Bayer) and ketamine hydrochloride/chlorbutol (Imalgene; Merial) (1:4) at 1 ml per kg of body weight, and then perfused intra-aortically with 0.9% NaCl followed by 5 ml/g body weight of Somogyi (Paraformaldehyde, 4% (w/v) and picric acid, 0.2% (vol/vol), in 0.1M PBS at pH 7.4. After perfusion, brains were dissected out in sagittal in two parts and post-fixed using Somogyi during 2 hours at room temperature. Brain blocks were rinsed successively for 10 min, 30 min, and 2 hours with 0.1M PBS solution and cryoprotected in 10%, 20% and 30% (w/v) sucrose in PBS sequentially, until they sank. After cryoprotection, 40- μm -thick sagittal sections were obtained with a freezing-sliding cryostat (Leica; CM1950 AgProtect). Caution was always taken in order to ensure that the section angles amongst the different conditions were kept equivalent. The sections were collected serially in a 12 well plate in 0.1 M PBS and rinsed 3 times for 10 min in 0.1M PBS and used for subsequent immunohistochemistry and Nissl staining. The section-containing wells that were not used were kept in freezer mix (polyethylene glycol, 30% by vol and glycerol 30% by vol in 0.1 M PBS) at -20°C . For immunohistochemistry, sections were incubated sequentially in (i) 5 mg/ml sodium borohydride in PBS for 30 min (to remove aldehyde autofluorescence); (ii) three PBS washes of 10 min each; (iii) 1:500 anti-MAP2 (AP-20; Abcam #11268) or 1:500 anti-beta III Tubulin (Abcam #18207) in 0.02% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and 5% goat serum (Jackson Immuno-Research) in 0.1 M PBS for 72 hours at 4°C ; (iv) three PBS washes of 10 min each; (v) fluorophore conjugated secondary antibodies, 1:500 Cy2 goat anti-mouse or 1:500 Cy3 goat anti-rabbit (Jackson Immuno-Research) in PBS for 2 hours at room temperature; and (vi) 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI in PBS for 10 min at room temperature. After rinsing with PBS, sections were mounted with Fluoromount (Sigma-Aldrich) aqueous mounting medium and lamelles couvre-objects (MenzelTM, Thermo)(Bobo-Jiménez et al. 2017).

Nissl staining. Sections obtained as previously described were mounted in slides and left to dry overnight at room temperature. Slides were immersed in a Coplin jar in absolute ethanol and chloroform mix (1:1)

overnight, and sequentially immersed for 5 min each in a battery of ethanol solutions at decreasing concentrations, starting from xylol down to distilled water for rehydration. Then, the slides were immersed again in Nissl dye, consisting of 0.1% (wt/vol) cresyl violet and 0.3% (vol/vol) glacial acetic in water, for 10 min at room temperature. Afterwards, slides were washed under tap water, distilled water and, finally, of ethanol solutions at increasing concentrations, starting from 96% ethanol down to xylol for deshydration, and mounted in Entellan® solution (Sigma).

Imaging and quantification. Sections were examined with epifluorescence and appropriate filter sets using an inverted microscope (Nikon; Eclipse® Ti-E) equipped with a pre-centered fiber illuminator (Nikon; Intensilight C-HGFI), B/W CCD digital camera (Hamamatsu; ORCA-E.R.) and Plan 40×/0.65 ∞/0.17 WD 0.56 objective. Confocal images were acquired using a spectral laser confocal microscope (TCS-SL; Leica Microsystems). Large fields of view were acquired with an HCX 40×/0.75 PH2 Plan Fluotar with a pixel size of ~300 nm at a scan speed of 400 Hz using three-line averages. High-resolution images were acquired using an HCX 63×/1.4 – 0.60 Plan Apo CS oil objective with a pixel size of 100 nm and a z-step size of 290 nm at a scan speed of 400 Hz using three lines averages. Immunohistochemical digital images were used to analyze different proteins staining in the three most sagittal sections per animal from three different animals per condition (n=3). Images were exported into ImageJ in tiff format for processing. Before image analysis, a maximum-intensity projection over z-series projections spanning 15 to 19 μm was performed. Images were converted to gray scale 8-bit images and brightness/contrast was adjusted using the ImageJ “auto” function. All different staining was automatically delineated using the “auto setting threshold” (default method) and “dark background” functions of ImageJ. Threshold images were quantified as percent area (area fraction) using the “analyze-measure” function, which represents the percentage of pixels in the image that have been highlighted (% area)(Bobo-Jiménez et al. 2017).

Behavioural tests. Male mice (8-10 months old) were left to acclimatize in the room for not less than 15 min at the same time slot of the day (2 pm-8 pm). Tracking was carried out once at a time and carefully cleaning the apparatus with 70% ethanol between trials to remove any odor cues. An ANY-box® core was used, which contained a light grey base and an adjustable perpendicular stick holding a camera and an infrared photo-beam array to track the animal movement and to detect rearing behavior, respectively. Mouse movements were tracked with the ANY-maze® software and the AMi-maze® interface to register all parameters described subsequently. For the Open Field test, a 40 cm x 40 cm x 35 cm (w, d, h) black infrared transparent Perspex insert was used, and the arena was divided in three zones, namely border (8 cm wide), center (16 % of total arena) and intermediate (the remaining area). The test lasted for 10 min, the distance travelled, the number of rearings and the time spent in each zone were measured. Rotarod test (Rotarod apparatus, Model 47600, Ugo Basile) was used to analyze motor balance and coordination. Male mice were previously trained during three consecutive days, two days before the test. The rotarod conditions were a gradually acceleration from 4 to 25 r.p.m., reaching the final speed at 270 sec. To analyze the short-time memory, we used the Novel Object Recognition test (Stoelting) in a 40 cm x 40 cm x 35 cm (w, d, h) core with black infrared transparent Perspex insert, also tracked with the ANY-maze® software and the AMi-maze® interface to register the track of the mice. Mice were accustomed to this environment for 10 min during two consecutive days, and the test was performed on the third day. Mice were left to explore two identical equidistant cubes for 5 min (the familiarization phase) and returned for 15 min into its cage. One cube was substituted for a similar size and color sphere and mice were returned to the arena to explore the objects for other 5 min (the test phase). To score zone entries that consider the exploration of an object we consider the size of the object (3.8x3.8 cm) and the surrounding perimeter (6x6cm). The ability to recognize the sphere as a novel object was determined as discrimination index (DI) calculated as $[DI = (t_N - t_F) / (t_N + t_F)]$, where t_N is the time spent exploring the new object (sphere) and t_F is the time spent exploring the familiar object (cube). The number of evaluated animals per test was specified when corresponding ($8 \geq n \leq 13$).

Statistical analysis. Immunohistochemistry quantifications were performed in brain samples from three male mice (n=3). For experiments involving behaviour and those requiring *in vivo* or *ex vivo* samples, male mice were used and the number and ages of animals per condition are specified where appropriate.

In vitro experiments were evaluated at least with three independent biological replicates and the necessary technical replicates for each technique (typically, 4-6 replicates). Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) values. The statistical comparisons between two groups of values were performed using the two-tailed Student's t-test. In all cases, $p < 0.05$ values were considered significant. Statistics were performed using Microsoft Excel or the IBM SPSS Statistics software.

Referencias bibliográficas

- Abrahan, Carolina E., M. Fernanda Insua, Luis E. Politi, O. Lorena German, and Nora P. Rotstein. 2009. "Oxidative Stress Promotes Proliferation and Dedifferentiation of Retina Glial Cells in Vitro." *Journal of Neuroscience Research* 87(4):964–77.
- Acín-Pérez, Rebeca, Isabel Carrascoso, Francesc Baixauli, Marta Roche-Molina, Ana Latorre-Pellicer, Patricio Fernández-Silva, María Mittelbrunn, Francisco Sanchez-Madrid, Acisclo Pérez-Martos, Clifford A. Lowell, Giovanni Manfredi, and José Antonio Enríquez. 2014. "ROS-Triggered Phosphorylation of Complex II by Fgr Kinase Regulates Cellular Adaptation to Fuel Use." *Cell Metabolism*.
- Acin-Perez, Rebeca and Jose A. Enriquez. 2014a. "The Function of the Respiratory Supercomplexes: The Plasticity Model." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837(4):444–50.
- Acin-Perez, Rebeca and Jose A. Enriquez. 2014b. "The Function of the Respiratory Supercomplexes: The Plasticity Model." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*.
- Acín-Pérez, Rebeca, Patricio Fernández-Silva, Maria Luisa Peleato, Acisclo Pérez-Martos, and Jose Antonio Enriquez. 2008a. "Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes." *Molecular Cell* 32(4):529–39.
- Acín-Pérez, Rebeca, Patricio Fernández-Silva, Maria Luisa Peleato, Acisclo Pérez-Martos, and Jose Antonio Enriquez. 2008b. "Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes." *Molecular Cell*.
- Adamsky, Adar and Inbal Goshen. 2018. "Astrocytes in Memory Function: Pioneering Findings and Future Directions." *Neuroscience*.
- Adamsky, Adar, Adi Kol, Tirzah Kreisel, Adi Doron, Nofar Ozeri-Engelhard, Talia Melcer, Ron Refaeli, Henrike Horn, Limor Regev, Maya Groysman, Michael London, and Inbal Goshen. 2018. "Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement." *Cell* 174(1):59-71.e14.
- Ago, Tetsuro, Tong Liu, Peiyong Zhai, Wei Chen, Hong Li, Jeffery D. Molkentin, Stephen F. Vatner, and Junichi Sadoshima. 2008. "A Redox-Dependent Pathway for Regulating Class II HDACs and Cardiac Hypertrophy." *Cell*.
- Allaman, Igor, Mireille Bélanger, and Pierre J. Magistretti. 2011. "Astrocyte–Neuron Metabolic Relationships: For Better and for Worse." *Trends in Neurosciences* 34(2):76–87.
- Almeida, A., J. Almeida, J. P. Bolanos, and S. Moncada. 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* 98(26):15294–99.
- Almeida, Angeles and José M. Medina. 1998. "A Rapid Method for the Isolation of Metabolically Active Mitochondria from Rat Neurons and Astrocytes in Primary Culture." *Brain Research Protocols*.
- Almeida, Angeles, Salvador Moncada, and Juan P. Bolaños. 2004. "Nitric Oxide Switches on Glycolysis through the AMP Protein Kinase and 6-Phosphofructo-2-Kinase Pathway." *Nature Cell Biology* 6(1):45–51.
- Anastasiou, D., G. Poulogiannis, J. M. Asara, M. B. Boxer, J. -k. Jiang, M. Shen, G. Bellinger, A. T. Sasaki, J. W. Locasale, D. S. Auld, C. J. Thomas, M. G. Vander Heiden, and L. C. Cantley. 2011. "Inhibition of Pyruvate Kinase M2 by Reactive Oxygen Species Contributes to Cellular Antioxidant Responses." *Science* 334(6060):1278–83.
- Andersen, Julie K. 2004. "Oxidative Stress in Neurodegeneration: Cause or Consequence?" *Nature Reviews Neuroscience*.
- Angelova, Plamena R. and Andrey Y. Abramov. 2016. "Functional Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology." *Free Radical Biology and Medicine* 100:81–85.
- Antunes, M. and G. Biala. 2012. "The Novel Object Recognition Memory: Neurobiology, Test Procedure, and Its Modifications." *Cognitive Processing* 13(2):93–110.
- Aragno, Manuela and Raffaella Mastrocola. 2017. "Dietary Sugars and Endogenous Formation of Advanced Glycation Endproducts: Emerging Mechanisms of Disease." *Nutrients* 9(4):1–16.
- Aryaman, Javid, Iain G. Johnston, and Nick S. Jones. 2019. "Mitochondrial Heterogeneity." *Frontiers in Genetics* 9:718.
- Attwell, David and Simon B. Laughlin. 2001. "An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 21(10):1133–45.

- Bak, Lasse K., Arne Schousboe, and Helle S. Waagepetersen. 2006. "The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle: Aspects of Transport, Neurotransmitter Homeostasis and Ammonia Transfer." *Journal of Neurochemistry* 98(3):641–53.
- Barros, L. F., R. Courjaret, P. Jakoby, A. Loaiza, C. Lohr, and J. W. Deitmer. 2009. "Preferential Transport and Metabolism of Glucose in Bergmann Glia over Purkinje Cells: A Multiphoton Study of Cerebellar Slices." *Glia* 57(9):962–70.
- Barros, L. Felipe. 2013. "Metabolic Signaling by Lactate in the Brain." *Trends in Neurosciences*.
- Barros, L. Felipe, Angus Brown, and Raymond A. Swanson. 2018. "Glia in Brain Energy Metabolism: A Perspective." *GLIA* 66(6).
- Barros, L. Felipe and Joachim W. Deitmer. 2010. "Glucose and Lactate Supply to the Synapse." *Brain Research Reviews* 63(1–2):149–59.
- Basisty, Nathan, Dao Fu Dai, Arni Gagnidze, Lemuel Gitari, Jeanne Fredrickson, Yvonne Maina, Richard P. Beyer, Mary J. Emond, Edward J. Hsieh, Michael J. MacCoss, George M. Martin, and Peter S. Rabinovitch. 2016. "Mitochondrial-Targeted Catalase Is Good for the Old Mouse Proteome, but Not for the Young: ???Reverse??? Antagonistic Pleiotropy?" *Aging Cell* 15(4):634–45.
- Bélanger, Mireille, Igor Allaman, and Pierre J. Magistretti. 2011. "Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation." *Cell Metabolism* 14(6):724–38.
- Le Belle, Janel E., Nicolas M. Orozco, Andres A. Paucar, Jonathan P. Saxe, Jack Mottahedeh, April D. Pyle, Hong Wu, and Harley I. Kornblum. 2011. "Proliferative Neural Stem Cells Have High Endogenous ROS Levels That Regulate Self-Renewal and Neurogenesis in a PI3K/Akt-Dependant Manner." *Cell Stem Cell* 8(1):59–71.
- Bigarella, Carolina L., Raymond Liang, and Saghi Ghaffari. 2014. "Stem Cells and the Impact of ROS Signaling." *Development (Cambridge, England)* 141(22):4206–18.
- Bobo-Jiménez, Verónica, María Delgado-Esteban, Julie Angibaud, Irene Sánchez-Morán, Antonio de la Fuente, Javier Yajeya, U. Valentin Nägerl, José Castillo, Juan P. Bolaños, and Angeles Almeida. 2017. "APC/C Cdh1 - Rock2 Pathway Controls Dendritic Integrity and Memory." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(17):4513–18.
- Bockaert, Joël and Philippe Marin. 2015. "mTOR in Brain Physiology and Pathologies." *Physiological Reviews* 95(4):1157–87.
- Boekema, Egbert J. and Hans-Peter Braun. 2007. "Supramolecular Structure of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System." *The Journal of Biological Chemistry* 282(1):1–4.
- Bolaños, Juan P. 2016. "Bioenergetics and Redox Adaptations of Astrocytes to Neuronal Activity." *Journal of Neurochemistry*.
- Bonora, Nicolás. 2018. "Contribution to the Biochemical Characterization of Astrocytes Expressing a Mitochondrial-Tagged Form of Catalase."
- Bouzier-Sore, Anne-Karine, Pierre Voisin, Paul Canioni, Pierre J. Magistretti, and Luc Pellerin. 2003. "Lactate Is a Preferential Oxidative Energy Substrate over Glucose for Neurons in Culture." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23(11):1298–1306.
- Bouzier-Sore, Anne Karine and Juan P. Bolaños. 2015. "Uncertainties in Pentose-Phosphate Pathway Flux Assessment Underestimate Its Contribution to Neuronal Glucose Consumption: Relevance for Neurodegeneration and Aging." *Frontiers in Aging Neuroscience*.
- Brand, Martin D. 2010. "The Sites and Topology of Mitochondrial Superoxide Production." *Experimental Gerontology* 45(7–8):466–72.
- Brewer, Rachel A., Victoria K. Gibbs, Daniel L. Smith, and Jr. 2016. "Targeting Glucose Metabolism for Healthy Aging." *Nutrition and Healthy Aging* 4(1):31–46.
- Burda, Joshua E. and Michael V. Sofroniew. 2014. "Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease." *Neuron* 81(2):229–48.
- Burdon, Roy H. 1995. "Superoxide and Hydrogen Peroxide in Relation to Mammalian Cell Proliferation." *Free Radical Biology and Medicine* 18(4):775–94.

- Buxton, Richard B. 2010. "Interpreting Oxygenation-Based Neuroimaging Signals: The Importance and the Challenge of Understanding Brain Oxygen Metabolism." *Frontiers in Neuroenergetics* 2:8.
- Chan, Ken Y., Min J. Jang, Bryan B. Yoo, Alon Greenbaum, Namita Ravi, Wei-Li Wu, Luis Sánchez-Guardado, Carlos Lois, Sarkis K. Mazmanian, Benjamin E. Deverman, and Viviana Gradinaru. 2017. "Engineered AAVs for Efficient Noninvasive Gene Delivery to the Central and Peripheral Nervous Systems." *Nature Neuroscience* 20(8):1172–79.
- Chanpimol, Shane, Bryant Seamon, Haniel Hernandez, Michael Harris-love, and Marc R. Blackman. 2017. "HHS Public Access." 133(4):572–81.
- Chelikani, P., I. Fita, and P. C. Loewen. 2004. "Diversity of Structures and Properties among Catalases." *Cellular and Molecular Life Sciences* 61(2):192–208.
- Chen, Zhongyi, Brian Siu, Ye-Shih Ho, Renaud Vincent, Chu Chang Chua, Ronald C. Hamdy, and Balvin H. L. Chua. 1998. "Overexpression of MnSOD Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Transgenic Mice." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 30(11):2281–89.
- Choleris, E., A. W. Thomas, M. Kavaliers, and F. S. Prato. 2001. "A Detailed Ethological Analysis of the Mouse Open Field Test: Effects of Diazepam, Chlordiazepoxide and an Extremely Low Frequency Pulsed Magnetic Field." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25(3):235–60.
- Chuquet, J., P. Quilichini, E. A. Nimchinsky, and G. Buzsaki. 2010. "Predominant Enhancement of Glucose Uptake in Astrocytes versus Neurons during Activation of the Somatosensory Cortex." *Journal of Neuroscience* 30(45):15298–303.
- Circu, Magdalena L. and Tak Yee Aw. 2010. "Reactive Oxygen Species, Cellular Redox Systems, and Apoptosis." *Free Radical Biology and Medicine* 48(6):749–62.
- Cobley, James Nathan, Maria Luisa Fiorello, and Damian Miles Bailey. 2018. "13 Reasons Why the Brain Is Susceptible to Oxidative Stress." *Redox Biology*.
- Cogliati, Sara, Christian Frezza, Maria Eugenia Soriano, Tatiana Varanita, Ruben Quintana-Cabrera, Mauro Corrado, Sara Cipolat, Veronica Costa, Alberto Casarin, Ligia C. Gomes, Ester Perales-Clemente, Leonardo Salviati, Patricio Fernandez-Silva, Jose A. Enriquez, and Luca Scorrano. 2013. "Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency." *Cell* 155(1):160–71.
- Conrad, Marcus, Joel Schick, and Jose Pedro Friedmann Angeli. 2013. "Glutathione and Thioredoxin Dependent Systems in Neurodegenerative Disease: What Can Be Learned from Reverse Genetics in Mice." *Neurochemistry International* 62(5):738–49.
- Court, Steven J., Bartłomiej Waclaw, and Rosalind J. Allen. 2015. "Lower Glycolysis Carries a Higher Flux than Any Biochemically Possible Alternative." *Nature Communications* 6:1–8.
- D'Autréaux, Benoît and Michel B. Toledano. 2007. "ROS as Signalling Molecules: Mechanisms That Generate Specificity in ROS Homeostasis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(10):813–24.
- DeFelipe, Javier, Pedro L. López-Cruz, Ruth Benavides-Piccione, Concha Bielza, Pedro Larrañaga, Stewart Anderson, Andreas Burkhalter, Bruno Cauli, Alfonso Fairén, Dirk Feldmeyer, Gord Fishell, David Fitzpatrick, Tamás F. Freund, Guillermo González-Burgos, Shaul Hestrin, Sean Hill, Patrick R. Hof, Josh Huang, Edward G. Jones, Yasuo Kawaguchi, Zoltán Kisvárdy, Yoshiyuki Kubota, David A. Lewis, Oscar Marín, Henry Markram, Chris J. McBain, Hanno S. Meyer, Hannah Monyer, Sacha B. Nelson, Kathleen Rockland, Jean Rossier, John L. R. Rubenstein, Bernardo Rudy, Massimo Scanziani, Gordon M. Shepherd, Chet C. Sherwood, Jochen F. Staiger, Gábor Tamás, Alex Thomson, Yun Wang, Rafael Yuste, and Giorgio A. Ascoli. 2013. "New Insights into the Classification and Nomenclature of Cortical GABAergic Interneurons." *Nature Reviews Neuroscience* 14(3):202–16.
- Dinkova-Kostova, Albena T. and Andrey Y. Abramov. 2015. "The Emerging Role of Nrf2 in Mitochondrial Function." *Free Radical Biology and Medicine* 88(Part B):179–88.
- Domingues, Helena S., Camila C. Portugal, Renato Socodato, and João B. Relvas. 2016. "Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4:71.
- Dunn, Laura, Vanessa Fairfield, Shanay Daham, Juan P. Bolaños, and Simon J. Heales. 2014. "Pentose-Phosphate

- Pathway Disruption in the Pathogenesis of Parkinson's Disease." *Translational Neuroscience* 5(3):179–84.
- Efeyan, Alejo, Roberto Zoncu, and David M. Sabatini. 2012. "Amino Acids and MTORC1: From Lysosomes to Disease." *Trends in Molecular Medicine* 18(9):524–33.
- Eisen, Michael B., Paul T. Spellman, Patrick O. Brown, and David Botstein. 1998. "Cluster Analysis and Display of Genome-Wide Expression Patterns." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(25).
- Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicologic Pathology* 35(4):495–516.
- Emerit, J., M. Edeas, and F. Bricaire. 2004. "Neurodegenerative Diseases and Oxidative Stress." *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 58(1):39–46.
- Erard, Marie, Sophie Dupré-Crochet, and Oliver Nüße. 2018. "Biosensors for Spatiotemporal Detection of Reactive Oxygen Species in Cells and Tissues." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 314(5):R667–83.
- Eraso-Pichot, Abel, Marina Brasó-Vives, Arantxa Golbano, Carmen Menacho, Enrique Claro, Elena Galea, and Roser Masgrau. 2018. "GSEA of Mouse and Human Mitochondriomes Reveals Fatty Acid Oxidation in Astrocytes." *Glia* 66(8):1724–35.
- Espósito, Giovanni, Melissa Vos, Sven Vilain, Jef Swerts, Jorge De Sousa Valadas, Stefanie Van Meensel, Onno Schaap, and Patrik Verstreken. 2013. "Aconitase Causes Iron Toxicity in Drosophila Pink1 Mutants" edited by B. Lu. *PLoS Genetics* 9(4):e1003478.
- Esteras, Noemí, Albená T. Dinkova-Kostova, and Andrey Y. Abramov. 2016. "Nrf2 Activation in the Treatment of Neurodegenerative Diseases: A Focus on Its Role in Mitochondrial Bioenergetics and Function." *Biological Chemistry* 397(5):383–400.
- Falkowska, Anna, Izabela Gutowska, Marta Goschorska, Przemysław Nowacki, Dariusz Chlubek, and Irena Baranowska-Bosiacka. 2015. "Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism." *International Journal of Molecular Sciences* 16(11):25959–81.
- Fanelli, Francesca, Sara Sepe, Marcello D'Amelio, Cinzia Bernardi, Loredana Cristiano, AnnaMaria Cimini, Francesco Ceconi, Maria Paola Ceru', and Sandra Moreno. 2013. "Age-Dependent Roles of Peroxisomes in the Hippocampus of a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Molecular Neurodegeneration* 8(1):8.
- Feigin, Valery L., Amanuel Alemu Abajobir, Kalkidan Hassen Abate, Foad Abd-Allah, Abdishakur M. Abdulle, Semaw Ferede Abera, Gebre Yitayih Abyu, Muktar Beshir Ahmed, Amani Nidhal Aichour, Ibtihel Aichour, Miloud Taki Eddine Aichour, Rufus Olusola Akinyemi, Samer Alabed, Rajaa Al-Raddadi, Nelson Alvis-Guzman, Azmeraw T. Amare, Hossein Ansari, Palwasha Anwari, Johan Ärnlöv, and Et Al. 2017. "Global, Regional, and National Burden of Neurological Disorders during 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015." *The Lancet Neurology* 16(11):877–97.
- Fernandez-Fernandez, Seila, Angeles Almeida, and Juan P. Bolaños. 2012. "Antioxidant and Bioenergetic Coupling between Neurons and Astrocytes." *Biochemical Journal* 443:3–11.
- Feron, Olivier. 2009. "Pyruvate into Lactate and Back: From the Warburg Effect to Symbiotic Energy Fuel Exchange in Cancer Cells." *Radiotherapy and Oncology* 92(3):329–33.
- Ferris, Heather A., Rachel J. Perry, Gabriela V. Moreira, Gerald I. Shulman, Jay D. Horton, and C. Ronald Kahn. 2017. "Loss of Astrocyte Cholesterol Synthesis Disrupts Neuronal Function and Alters Whole-Body Metabolism." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(5):1189–94.
- Finkel, Toren and Nikki J. Holbrook. 2000. "Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing." *Nature* 2000 408:6809.
- Fisher, St John, Regina Blackley, Matthew Stryker, Susan Denapoli, Melinda E. Lull, Regina ;. Blackley, Matthew ;. Stryker, and Susan ;. Denapoli. 2014. *The Differential Effects of Fructose and Glucose on Advanced Glycation End-Product Formation and Cellular Damage in Vitro* Publication Information *The Differential Effects of Fructose and Glucose on Advanced Glycation End-Product Formation and Cellular Damage in Vitro The Differential Effects of Fructose and Glucose on Advanced Glycation End-Product Formation and Cellular Damage in Vitro.*

- Fontaine, Danielle A. and Dawn Belt Davis. 2016. "Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium." *Diabetes* 65(1):25–33.
- Freeman, H. C., A. Hugill, N. T. Dear, F. M. Ashcroft, and R. D. Cox. 2006. "Deletion of Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase: A New Quantitative Trait Locus Accounting for Glucose Intolerance in C57BL/6J Mice." *Diabetes* 55(7):2153–56.
- Freitas, Hércules, Gustavo Ferreira, Isis Trevenzoli, Karen Oliveira, and Ricardo de Melo Reis. 2017. "Fatty Acids, Antioxidants and Physical Activity in Brain Aging." *Nutrients* 9(11):1263.
- Fujikawa, Yuuta, Leticia P. Roma, Mirko C. Sobotta, Adam J. Rose, Mauricio Berriel Diaz, Giuseppe Locatelli, Michael O. Breckwoldt, Thomas Misgeld, Martin Kerschensteiner, Stephan Herzig, Karin Müller-Decker, and Tobias P. Dick. 2016. "Mouse Redox Histology Using Genetically Encoded Probes." *Science Signaling* 9(419).
- Görlach, Agnes, Elitsa Y. Dimova, Andreas Petry, Antonio Martínez-Ruiz, Pablo Hernansanz-Agustín, Anabela P. Rolo, Carlos M. Palmeira, and Thomas Kietzmann. 2015. "Reactive Oxygen Species, Nutrition, Hypoxia and Diseases: Problems Solved?" *Redox Biology* 6:372–85.
- García-Cáceres, Cristina, Eglantine Balland, Vincent Prevot, Serge Luquet, Stephen C. Woods, Marco Koch, Tamas L. Horvath, Chun-Xia Yi, Julia A. Chowen, Alexei Verkhratsky, Alfonso Araque, Ingo Bechmann, and Matthias H. Tschöp. 2018. "Role of Astrocytes, Microglia, and Tanycytes in Brain Control of Systemic Metabolism." *Nature Neuroscience*.
- GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators, E. Ray, Alexis Elbaz, Emma Nichols, Foad Abd-Allah, and Et Al. 2018. "Global, Regional, and National Burden of Parkinson's Disease, 1990-2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." *The Lancet. Neurology* 17(11):939–53.
- Georgieff, Michael K. 2007. "Nutrition and the Developing Brain: Nutrient Priorities and Measurement." *The American Journal of Clinical Nutrition* 85(2):614S-620S.
- Gómez-Gonzalo, Marta, Mario Martín-Fernández, Ricardo Martínez-Murillo, Sara Mederos, Alicia Hernández-Vivanco, Stephanie Jamison, Ana P. Fernández, Julia Serrano, Pilar Calero, Hunter S. Futch, Rubén Corpas, Coral Sanfeliu, Gertrudis Perea, and Alfonso Araque. 2017. "Neuron-Astrocyte Signaling Is Preserved in the Aging Brain." *Glia* 65(4):569–80.
- Goodman, Michael, Roberd M. Bostick, Omer Kucuk, and Dean P. Jones. 2011. "Clinical Trials of Antioxidants as Cancer Prevention Agents: Past, Present, and Future." *Free Radical Biology and Medicine* 51(5):1068–84.
- Görlach, Agnes, Elitsa Y. Dimova, Andreas Petry, Antonio Martínez-Ruiz, Pablo Hernansanz-Agustín, Anabela P. Rolo, Carlos M. Palmeira, and Thomas Kietzmann. 2015. "Reactive Oxygen Species, Nutrition, Hypoxia and Diseases: Problems Solved?" *Redox Biology* 6(AUGUST):372–85.
- Green, Douglas R. and Bennett Van Houten. 2011. "SnapShot: Mitochondrial Quality Control." *Cell* 147(4):950-950.e1.
- Greer, Samantha N., Julie L. Metcalf, Yi Wang, and Michael Ohh. 2012. "The Updated Biology of Hypoxia-Inducible Factor." *EMBO Journal* 31(11):2448–60.
- Gugliucci, Alejandro. 2017. "Formation of Fructose-Mediated Advanced Glycation End Products and Their Roles in Metabolic and Inflammatory Diseases." *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 8(1):54–62.
- Guo, Runyu, Jinke Gu, Shuai Zong, Meng Wu, and Maojun Yang. 2018. "Structure and Mechanism of Mitochondrial Electron Transport Chain." *Biomedical Journal* 41(1):9–20.
- Gusnard, Debra A. and Marcus E. Raichle. 2001. "Searching for a Baseline: Functional Imaging and the Resting Human Brain." *Nature Reviews Neuroscience* 2(10):685–94.
- Halliwel, Barry. 2013. "The Antioxidant Paradox: Less Paradoxical Now?" *British Journal of Clinical Pharmacology* 75(3):637–44.
- Hammond, Sean L., Ashley N. Leek, Evan H. Richman, and Ronald B. Tjalkens. 2017. "Cellular Selectivity of AAV Serotypes for Gene Delivery in Neurons and Astrocytes by Neonatal Intracerebroventricular Injection." *PLoS ONE* 12(12):1–22.
- Hardwick, J. S., B. M. Sefton, K. Yamaguchi, H. Koide, N. Fujisawa, U. Kikkawa, S. Sahara, Y. Fukami, and Y. Nishizuka. 1995. "Activation of the Lck Tyrosine Protein Kinase by Hydrogen Peroxide Requires the

- Phosphorylation of Tyr-394." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(10):4527–31.
- Hashimoto, Kenji. 2018. "Essential Role of Keap1-Nrf2 Signaling in Mood Disorders: Overview and Future Perspective." *Frontiers in Pharmacology* 9:1182.
- Heinzel, B., M. John, P. Klatt, E. Böhme, and B. Mayer. 1992. "Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Formation of Hydrogen Peroxide by Brain Nitric Oxide Synthase." *The Biochemical Journal* 281 (Pt 3)(Pt 3):627–30.
- Herrero-Mendez, Angel, Angeles Almeida, Emilio Fernández, Carolina Maestre, Salvador Moncada, and Juan P Bolaños. 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):747–52.
- Herrero-Mendez, Angel, Angeles Almeida, Emilio Fernández, Carolina Maestre, Salvador Moncada, and Juan P. Bolaños. 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*.
- Heyland, Daren, John Muscedere, Paul E. Wischmeyer, Deborah Cook, Gwynne Jones, Martin Albert, Gunnar Elke, Mette M. Berger, and Andrew G. Day. 2013. "A Randomized Trial of Glutamine and Antioxidants in Critically Ill Patients." *New England Journal of Medicine* 368(16):1489–97.
- Hirose, Misa, Paul Schilf, Yask Gupta, Marvin N. Wright, Marvin N. Wright, Olaf Jöhren, Anika E. Wagner, Christian Sina, Andreas Ziegler, Michael Ristow, and Saleh M. Ibrahim. 2016. "Lifespan Effects of Mitochondrial Mutations." *Nature* 540(7633):E13–14.
- Hirrlinger, Petra G., Anja Scheller, Christian Braun, Johannes Hirrlinger, and Frank Kirchhoff. 2006. "Temporal Control of Gene Recombination in Astrocytes by Transgenic Expression of the Tamoxifen-Inducible DNA Recombinase Variant CreERT2." *Glia* 54(1):11–20.
- Ho, Ye-Shih, Ye Xiong, Dorothy S. Ho, Jinping Gao, Balvin H. L. Chua, Harish Pai, and John J. Miele. 2007. "Targeted Disruption of the Glutaredoxin 1 Gene Does Not Sensitize Adult Mice to Tissue Injury Induced by Ischemia/Reperfusion and Hyperoxia." *Free Radical Biology and Medicine* 43(9):1299–1312.
- Ho, Ye Shih, Ye Xiong, Wanchao Ma, Abraham Spector, and Dorothy S. Ho. 2004. "Mice Lacking Catalase Develop Normally but Show Differential Sensitivity to Oxidant Tissue Injury." *Journal of Biological Chemistry* 279(31):32804–12.
- Holmgren, Arne and Jun Lu. 2010. "Thioredoxin and Thioredoxin Reductase: Current Research with Special Reference to Human Disease." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396(1):120–24.
- Holmström, Kira M and Toren Finkel. 2014. "Cellular Mechanisms and Physiological Consequences of Redox-Dependent Signalling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15(6).
- Holmström, Kira M. and Toren Finkel. 2014. "Cellular Mechanisms and Physiological Consequences of Redox-Dependent Signalling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(6):411–21.
- Hopkins, Robert. 2016a. "Hydrogen Peroxide in Biology and Medicine: An Overview." *Reactive Oxygen Species* 3(7):26–37.
- Hopkins, Robert. 2016b. "Superoxide in Biology and Medicine: An Overview." *Reactive Oxygen Species* 1(2):99–109.
- Van Houten, Bennett, Victoria Woshner, and Janine H. Santos. 2006. "Role of Mitochondrial DNA in Toxic Responses to Oxidative Stress." *DNA Repair* 5(2):145–52.
- Hsu, Peggy P. and David M. Sabatini. 2008. "Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond." *Cell* 134(5):703–7.
- Huang, Da Wei, Brad T. Sherman, and Richard A. Lempicki. 2009. "Bioinformatics Enrichment Tools: Paths toward the Comprehensive Functional Analysis of Large Gene Lists." *Nucleic Acids Research* 37(1):1–13.
- Huang, Da Wei, Brad T Sherman, and Richard A. Lempicki. 2009. "Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources." *Nature Protocols* 4(1):44–57.
- Huchzermeyer, Christine, Nikolaus Berndt, Hermann-Georg Holzhütter, and Oliver Kann. 2013. "Oxygen Consumption Rates during Three Different Neuronal Activity States in the Hippocampal CA3 Network." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33(2):263–71.
- Ishii, Takamasa, Yumi Takanashi, Koichi Sugita, Masaki Miyazawa, Rintaro Yanagihara, Kayo Yasuda, Hiromi

- Onouchi, Noboru Kawabe, Munehiro Nakata, Yorihiro Yamamoto, Phil S. Hartman, and Naoaki Ishii. 2016. "Endogenous Reactive Oxygen Species Cause Astrocyte Defects and Neuronal Dysfunctions in the Hippocampus: A New Model for Aging Brain." *Aging Cell* (August):1–13.
- Islam, Md Torequl. 2017. "Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction-Linked Neurodegenerative Disorders." *Neurological Research* 39(1):73–82.
- J. Magistretti, Pierre and Igor Allaman. 2016. "Brain Energy and Metabolism." Pp. 1879–1909 in *Neuroscience in the 21st Century*. New York, NY: Springer New York.
- Jimenez-Blasco, D., P. Santofimia-Castanõ, A. Gonzalez, A. Almeida, and J. P. Bolaños. 2015. "Astrocyte NMDA Receptors' Activity Sustains Neuronal Survival through a Cdk5-Nrf2 Pathway." *Cell Death and Differentiation*.
- Jimenez-Blasco, D, P. Santofimia-Castaño, a Gonzalez, a Almeida, and J. P. Bolaños. 2015. "Astrocyte NMDA Receptors' Activity Sustains Neuronal Survival through a Cdk5–Nrf2 Pathway." *Cell Death and Differentiation*.
- Jonckheere, A. I., M. Huigsloot, A. J. M. Janssen, A. J. H. Kappen, J. A. M. Smeitink, and R. J. T. Rodenburg. 2010. "High-Throughput Assay to Measure Oxygen Consumption in Digitonin-Permeabilized Cells of Patients with Mitochondrial Disorders." *Clinical Chemistry* 56(3):424–31.
- Juránek, Ivo, Dragana Nikitovic, Dimitrios Kouretas, A. Wallace Hayes, and Aristidis M. Tsatsakis. 2013. "Biological Importance of Reactive Oxygen Species in Relation to Difficulties of Treating Pathologies Involving Oxidative Stress by Exogenous Antioxidants." *Food and Chemical Toxicology* 61:240–47.
- Kaludercic, Nina, Soni Deshwal, and Fabio Di Lisa. 2014. "Reactive Oxygen Species and Redox Compartmentalization." *Frontiers in Physiology* 5:285.
- Kalyanaraman, Balaraman, Victor Darley-Usmar, Kelvin J. A. Davies, Phyllis A. Dennerly, Henry Jay Forman, Matthew B. Grisham, Giovanni E. Mann, Kevin Moore, L. Jackson Roberts, and Harry Ischiropoulos. 2012. "Measuring Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Fluorescent Probes: Challenges and Limitations." *Free Radical Biology and Medicine* 52(1):1–6.
- Kamat, Chandrashekar D., Sunyana Gadgil, Molina Mhatre, Kelly S. Williamson, Quentin N. Pye, and Kenneth Hensley. 2008. "Antioxidants in Central Nervous System Diseases: Preclinical Promise and Translational Challenges." *Journal of Alzheimer's Disease*.
- Kim, J., G. Song, G. Wu, and F. W. Bazer. 2012. "Functional Roles of Fructose." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(25):E1619–28.
- Kim, Sun-Uk, Mei-Hua Jin, Yoon Sik Kim, Sang-Hee Lee, Yee Sook Cho, Kyoung-Joo Cho, Kyu-Sun Lee, Yang In Kim, Gyung Whan Kim, Jin-Man Kim, Tae-Hoon Lee, Young-Ho Lee, Minho Shong, Hyung-Chun Kim, Kyu-Tae Chang, Dae-Yeul Yu, and Dong-Seok Lee. 2011. "Peroxiredoxin II Preserves Cognitive Function against Age-Linked Hippocampal Oxidative Damage." *Neurobiology of Aging* 32(6):1054–68.
- Kimelberg, Harold K. 2009. "Astrocyte Heterogeneity or Homogeneity?" Pp. 1–25 in *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System*. Boston, MA: Springer US.
- Konishi, H., E. Yamauchi, H. Taniguchi, T. Yamamoto, H. Matsuzaki, Y. Takemura, K. Ohmae, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka. 2001. "Phosphorylation Sites of Protein Kinase C Delta in H₂O₂-Treated Cells and Its Activation by Tyrosine Kinase in Vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(12):6587–92.
- Kreft, Marko, Lasse K. Bak, Helle S. Waagepetersen, and Arne Schousboe. 2012. "Aspects of Astrocyte Energy Metabolism, Amino Acid Neurotransmitter Homeostasis and Metabolic Compartmentation." *Asn Neuro* 4(3):187–99.
- Kriegstein, Arnold R. and Magdalena Götz. 2003. "Radial Glia Diversity: A Matter of Cell Fate." *Glia* 43(1):37–43.
- Krushevskaya, D., H. Peterson, J. Reimand, M. Kull, and J. Vilo. 2009. "VisHiC--Hierarchical Functional Enrichment Analysis of Microarray Data." *Nucleic Acids Research* 37(Web Server):W587–92.
- Kurz, Tino, John W. Eaton, and Ulf T. Brunk. 2010. "Redox Activity Within the Lysosomal Compartment: Implications for Aging and Apoptosis." *Antioxidants & Redox Signaling* 13(4):511–23.
- Lapiente-Brun, Esther, Raquel Moreno-Loshuertos, Rebeca Acín-Pérez, Ana Latorre-Pellicer, Carmen Colás,

- Eduardo Balsa, Ester Perales-Clemente, Pedro M. Quirós, Enrique Calvo, M. A. Rodríguez-Hernández, Plácido Navas, Raquel Cruz, Ángel Carracedo, Carlos López-Otín, Acisclo Pérez-Martos, Patricio Fernández-Silva, Erika Fernández-Vizarra, and José Antonio Enríquez. 2013. "Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain." *Science (New York, N.Y.)* 340(6140):1567–70.
- Larrabee, M. G. 1990. "Evaluation of the Pentose Phosphate Pathway from ¹⁴CO₂ Data. Fallibility of a Classic Equation When Applied to Non-Homogeneous Tissues." *Biochemical Journal*.
- Latorre-Pellicer, Ana, Raquel Moreno-Loshuertos, Ana Victoria Lechuga-Vieco, Fátima Sánchez-Cabo, Carlos Torroja, Rebeca Acín-Pérez, Enrique Calvo, Esther Aix, Andrés González-Guerra, Angela Logan, Mariá Luisa Bernad-Miana, Eduardo Romanos, Raquel Cruz, Sara Cogliati, Beatriz Sobrino, Ángel Carracedo, Acisclo Pérez-Martos, Patricio Fernández-Silva, Jesús Ruíz-Cabello, Michael P. Murphy, Ignacio Flores, Jesús Vázquez, and José Antonio Enríquez. 2016. "Mitochondrial and Nuclear DNA Matching Shapes Metabolism and Healthy Ageing." *Nature* 535(7613):561–65.
- Lee, Seonmin, Eunyoung Tak, Jisun Lee, MA Rashid, Michael P. Murphy, Joohun Ha, and Sung Soo Kim. 2011. "Mitochondrial H₂O₂ Generated from Electron Transport Chain Complex I Stimulates Muscle Differentiation." *Cell Research* 21(5):817–34.
- Lee, Youngjin, Albee Messing, Mu Su, and Michael Brenner. 2008. "GFAP Promoter Elements Required for Region-Specific and Astrocyte-Specific Expression." *Glia* 56(5):481–93.
- Lewitus, Eric, Patrick R. Hof, and Chet C. Sherwood. 2012. "ORIGINAL ARTICLE PHYLOGENETIC COMPARISON OF NEURON AND GLIA DENSITIES IN THE PRIMARY VISUAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS OF CARNIVORES AND PRIMATES." *Evolution* 66–8:2551–2563.
- Li, Nianyu, Kathy Ragheb, Gretchen Lawler, Jennie Sturgis, Bartek Rajwa, J. Andres Melendez, and J. Paul Robinson. 2003. "Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production." *The Journal of Biological Chemistry* 278(10):8516–25.
- Li, Robert, Zhenquan Jia, and Michael A. Trush. 2016. "Defining ROS in Biology and Medicine." *Reactive Oxygen Species (Apex, N.C.)* 1(1):9–21.
- Li, Yibing, Ting-Ting Huang, Elaine J. Carlson, Simon Melov, Philip C. Ursell, Jean L. Olson, Linda J. Noble, Midori P. Yoshimura, Christoph Berger, Pak H. Chan, Douglas C. Wallace, and Charles J. Epstein. 1995. "Dilated Cardiomyopathy and Neonatal Lethality in Mutant Mice Lacking Manganese Superoxide Dismutase." *Nature Genetics* 11(4):376–81.
- Liemburg-Apers, Dania C., Peter H. G. M. Willems, Werner J. H. Koopman, and Sander Grefte. 2015. "Interactions between Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Cellular Glucose Metabolism." *Archives of Toxicology* 89(8):1209–26.
- Liu, Lucy, Kevin R. MacKenzie, Nagireddy Putluri, Mirjana Maletić-Savatić, and Hugo J. Bellen. 2017. "The Glia-Neuron Lactate Shuttle and Elevated ROS Promote Lipid Synthesis in Neurons and Lipid Droplet Accumulation in Glia via APOE/D." *Cell Metabolism* 26(5):719-737.e6.
- Liu, Ye, Jiangang Long, and Jiankang Liu. 2014. "Mitochondrial Free Radical Theory of Aging: Who Moved My Premise?" *Geriatrics and Gerontology International* 740–49.
- Lopez-Fabuel, Irene, Juliette Le Douce, Angela Logan, Andrew M. James, Gilles Bonvento, Michael P. Murphy, Angeles Almeida, and Juan P. Bolaños. 2016. "Complex I Assembly into Supercomplexes Determines Differential Mitochondrial ROS Production in Neurons and Astrocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(46).
- López-otín, Carlos, Maria A. Blasco, Linda Partridge, and Manuel Serrano. 2013. "Europe PMC Funders Group The Hallmarks of Aging." *Cell* 153(6):1194–1217.
- Lovatt, Ditte, Ursula Sonnewald, Helle S. Waagepetersen, Arne Schousboe, Wei He, Jane H-C Lin, Xiaoning Han, Takahiro Takano, Su Wang, Fraser J. Sim, Steven A. Goldman, and Maiken Nedergaard. 2007. "The Transcriptome and Metabolic Gene Signature of Protoplasmic Astrocytes in the Adult Murine Cortex."
- Lv, Xiu, Jincheng Li, Chuhong Zhang, Tian Hu, Sai Li, Sha He, Hanxing Yan, Yixi Tan, Mingsheng Lei, Meiling Wen, and Jianhong Zuo. 2017. "The Role of Hypoxia-Inducible Factors in Tumor Angiogenesis and Cell Metabolism." *Genes & Diseases* 4(1):19–24.

- Lyons, Declan G., Alexandre Parpaleix, Morgane Roche, and Serge Charpak. 2016. "Mapping Oxygen Concentration in the Awake Mouse Brain." *ELife* 5.
- Mächler, Philipp, Matthias T. Wyss, Maha Elsayed, Jillian Stobart, Robin Gutierrez, Alexandra Von Faber-Castell, Vincens Kaelin, Marc Zuend, Alejandro San Martín, Ignacio Romero-Gómez, Felipe Baeza-Lehnert, Sylvain Lengacher, Bernard L. Schneider, Patrick Aebischer, Pierre J. Magistretti, L. Felipe Barros, and Bruno Weber. 2016. "In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons." *Cell Metabolism* 23(1):94–102.
- Magistretti, Pierre J. 2011. "Neuron-Glia Metabolic Coupling and Plasticity." in *Experimental Physiology*.
- Magistretti, Pierre J. and Igor Allaman. 2015. "A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging." *Neuron*.
- Magistretti, Pierre J. and Igor Allaman. 2018. "Lactate in the Brain: From Metabolic End-Product to Signalling Molecule." *Nature Reviews Neuroscience* 19(4).
- Mallory, Caitlin S. and Lisa M. Giocomo. 2018. "Heterogeneity in Hippocampal Place Coding." *Current Opinion in Neurobiology* 49:158–67.
- Matsushima, Shouji, Tomomi Ide, Mayumi Yamato, Hidenori Matsusaka, Fumiyuki Hattori, Masaki Ikeuchi, Toru Kubota, Kenji Sunagawa, Yasuhiro Hasegawa, Tatsuya Kurihara, Shinzo Oikawa, Shintaro Kinugawa, and Hiroyuki Tsutsui. 2006. "Overexpression of Mitochondrial Peroxiredoxin-3 Prevents Left Ventricular Remodeling and Failure After Myocardial Infarction in Mice." *Circulation* 113(14):1779–86.
- Mattson, Mark P. and Thiruma V. Arumugam. 2018. "Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States." *Cell Metabolism* 27(6).
- Mattson, Mark P. and Aiwu Cheng. 2006. "Neurohormetic Phytochemicals: Low-Dose Toxins That Induce Adaptive Neuronal Stress Responses." *Trends in Neurosciences* 29(11):632–39.
- Maxwell, P. H., G. U. Dachs, J. M. Gleadle, L. G. Nicholls, A. L. Harris, I. J. Stratford, O. Hankinson, C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe. 1997. "Hypoxia-Inducible Factor-1 Modulates Gene Expression in Solid Tumors and Influences Both Angiogenesis and Tumor Growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(15):8104–9.
- Merry, Troy L. and Michael Ristow. 2016. "Nuclear Factor Erythroid-Derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) Mediates Exercise-Induced Mitochondrial Biogenesis and the Anti-Oxidant Response in Mice." *Journal of Physiology* 594(18):5195–5207.
- Miller, Sean J. 2018. "Astrocyte Heterogeneity in the Adult Central Nervous System." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12:401.
- Miyata, Toshio and Charles van Ypersele de Strihou. 2010. "Diabetic Nephropathy: A Disorder of Oxygen Metabolism?" *Nature Reviews Nephrology* 6(2):83–95.
- Monaghan, Richard M. and Alan J. Whitmarsh. 2015. "Mitochondrial Proteins Moonlighting in the Nucleus." *Trends in Biochemical Sciences* 40(12).
- Morgan, Bruce, Daria Ezeriņa, Theresa N. E. Amoako, Jan Riemer, Matthias Seedorf, and Tobias P. Dick. 2013. "Multiple Glutathione Disulfide Removal Pathways Mediate Cytosolic Redox Homeostasis." *Nature Chemical Biology* 9(2):119–25.
- Morita, Mitsuhiro, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Marko Kreft, Nina Vardjan, Robert Zorec, Mami Noda, Mitsuhiro Morita, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Marko Kreft, Nina Vardjan, Robert Zorec, and Mami Noda. 2019. "Metabolic Plasticity of Astrocytes and Aging of the Brain." *International Journal of Molecular Sciences* 20(4):941.
- Mullarky, Edouard and Lewis C. Cantley. 2015. *Diverting Glycolysis to Combat Oxidative Stress*. Springer.
- Murphy, Michael P. 2009. "How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species." *Biochemical Journal* 417(1):1–13.
- Nathan, Carl and Amy Cunningham-Bussel. 2013. "Beyond Oxidative Stress: An Immunologist's Guide to Reactive Oxygen Species." *Nature Reviews. Immunology* 13(5):349.
- Nathan, Carl and Aihao Ding. 2010. "Snapshot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI)." *Cell* 140(6):8–10.

- Navarrete, Marta, Alfonso Araque, Fernando De Castro, and George W. Huntley. 2014. "The Cajal School and the Physiological Role of Astrocytes: A Way of Thinking."
- Nayernia, Zeynab, Vincent Jaquet, and Karl-Heinz Krause. 2014. "New Insights on NOX Enzymes in the Central Nervous System." *Antioxidants & Redox Signaling* 20(17):2815–37.
- Neves Carvalho, Andreia, Omidreza Firuzi, Maria Joao Gama, Jack van Horsen, and Luciano Saso. 2017. "Oxidative Stress and Antioxidants in Neurological Diseases: Is There Still Hope?" *Current Drug Targets*.
- Nicholson, Anthony, Peter C. Reifsnnyder, Rachel D. Malcolm, Charlotte A. Lucas, Grant R. MacGregor, Weidong Zhang, and Edward H. Leiter. 2010. "Diet-Induced Obesity in Two C57BL/6 Substrains with Intact or Mutant Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (Nnt) Gene." *Obesity*.
- Nijtmans, L. G. J., Nadine S. Henderson, and Ian J. Holt. 2002. "Blue Native Electrophoresis to Study Mitochondrial and Other Protein Complexes." *Methods* 26(4):327–34.
- Niven, Jeremy E. 2016. "Neuronal Energy Consumption: Biophysics, Efficiency and Evolution." *Current Opinion in Neurobiology* 41:129–35.
- Nortley, Ross and David Attwell. 2017. "Control of Brain Energy Supply by Astrocytes." *Current Opinion in Neurobiology* 47.
- Okado-Matsumoto, Ayako and Irwin Fridovich. 2001. "Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver." *Journal of Biological Chemistry* 276(42):38388–93.
- Okuda, Hiroaki. 2018. "A Review of Functional Heterogeneity among Astrocytes and the CS56-Specific Antibody-Mediated Detection of a Subpopulation of Astrocytes in Adult Brains." *Anatomical Science International* 93(2):161–68.
- Oliveros, Juan. n.d. "VENNY. An Interactive Tool for Comparing Lists with Venn Diagrams." *BioinfoGP, CNB-CSIC*.
- Pang, Zhen, Gloria H. Umberger, and James W. Geddes. 2002. "Neuronal Loss and Cytoskeletal Disruption Following Intrahippocampal Administration of the Metabolic Inhibitor Malonate: Lack of Protection by MK-801." *Journal of Neurochemistry* 66(2):474–84.
- Pangršič, Tina, Maja Potokar, Matjaž Stenovec, Marko Kreft, Elsa Fabbretti, Andrea Nistri, Evgeny Pryazhnikov, Leonard Khiroug, Rashid Giniatullin, and Robert Zorec. 2007. "Exocytotic Release of ATP from Cultured Astrocytes." *Journal of Biological Chemistry* 282(39):28749–58.
- Park, Thomas J., Jane Reznick, Bethany L. Peterson, Gregory Blass, Damir Omerbašić, Nigel C. Bennett, P. Henning J. L. Kuich, Christin Zasada, Brigitte M. Browe, Wiebke Hamann, Daniel T. Applegate, Michael H. Radke, Tetiana Kosten, Heike Lutermann, Victoria Gavaghan, Ole Eigenbrod, Valérie Bégay, Vince G. Amoroso, Vidya Govind, Richard D. Minshall, Ewan St J. Smith, John Larson, Michael Gotthardt, Stefan Kempa, and Gary R. Lewin. 2017. "Fructose-Driven Glycolysis Supports Anoxia Resistance in the Naked Mole-Rat." *Science* 356(6335):307–11.
- Parpura, Vladimir, Trent A. Basarsky, Fang Liu, Ksenija Jeftinija, Srdija Jeftinija, and Philip G. Haydon. 1994. "Glutamate-Mediated Astrocyte-Neuron Signalling." *Nature*.
- Parpura, Vladimir and Robert Zorec. 2010. "Gliotransmission: Exocytotic Release from Astrocytes." *Brain Research Reviews* 63(1–2):83–92.
- Patella, Francesca, Zachary T. Schug, Erez Persi, Lisa J. Neilson, Zahra Erami, Daniele Avanzato, Federica Maione, Juan R. Hernandez-Fernaud, Gillian Mackay, Liang Zheng, Steven Reid, Christian Frezza, Enrico Giraudo, Alessandra Fiorio Pla, Kurt Anderson, Eytan Ruppin, Eyal Gottlieb, and Sara Zanivan. 2015. "Proteomics-Based Metabolic Modelling Reveals That Fatty Acid Oxidation Controls Endothelial Cell Permeability." *Molecular and Cellular Proteomics* 14(3):621–34.
- Pekny, Milos and Marcela Pekna. 2014. "Astrocyte Reactivity and Reactive Astroglia: Costs and Benefits." *Physiological Reviews* 94(4):1077–98.
- Pellerin, L. and P. J. Magistretti. 1994. "Glutamate Uptake into Astrocytes Stimulates Aerobic Glycolysis: A Mechanism Coupling Neuronal Activity to Glucose Utilization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(22):10625–29.
- Pellerin, Luc, Anne Karine Bouzier-Sore, Agnès Aubert, Sébastien Serres, Michel Merle, Robert Costalat, and Pierre

- J. Magistretti. 2007. "Activity-Dependent Regulation of Energy Metabolism by Astrocytes: An Update." *GLIA*.
- Pellerin, Luc and Pierre J. Magistretti. 2012. "Sweet Sixteen for ANLS." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32(7):1152–66.
- Perea, Gertrudis, Mriganka Sur, and Alfonso Araque. 2014. "Neuron-Glia Networks: Integral Gear of Brain Function." *Frontiers in Cellular Neuroscience*.
- Pfriege, Frank W. and Nicole Ungerer. 2011. "Cholesterol Metabolism in Neurons and Astrocytes." *Progress in Lipid Research* 50(4):357–71.
- Philips, Thomas and Jeffrey D. Rothstein. 2017. "Oligodendroglia: Metabolic Supporters of Neurons." *The Journal of Clinical Investigation* 127(9):3271–80.
- De Pittà, M., N. Brunel, and A. Volterra. 2016. "Astrocytes: Orchestrating Synaptic Plasticity?" *Neuroscience* 323:43–61.
- Prabhakar, N. R. and G. L. Semenza. 2012. "Adaptive and Maladaptive Cardiorespiratory Responses to Continuous and Intermittent Hypoxia Mediated by Hypoxia-Inducible Factors 1 and 2." *Physiological Reviews* 92(3):967–1003.
- Qiao, Jianlin, Jane F. Arthur, Elizabeth E. Gardiner, Robert K. Andrews, Lingyu Zeng, and Kailin Xu. 2018. "Redox Biology Regulation of Platelet Activation and Thrombus Formation by Reactive Oxygen Species." *Redox Biology* 14(August 2017):126–30.
- Quintana-Cabrera, Ruben, Seila Fernandez-Fernandez, Veronica Bobo-Jimenez, Javier Escobar, Juan Sastre, Angeles Almeida, and Juan P. Bolaños. 2012. "γ 3-Glutamylcysteine Detoxifies Reactive Oxygen Species by Acting as Glutathione Peroxidase-1 Cofactor." *Nature Communications*.
- Rama Rao, Kakulavarapu V and Tammy Kielian. 2015. "Neuron-Astrocyte Interactions in Neurodegenerative Diseases: Role of Neuroinflammation." *Clinical & Experimental Neuroimmunology* 6(3):245–63.
- Ramaswamy, Shilpa, Jodi L. McBride, and Jeffrey H. Kordower. 2007. "Animal Models of Huntington's Disease." *ILAR Journal* 48(4):356–73.
- Rao, Xiongjian, Xiaotao Duan, Weimin Mao, Xuexia Li, Zhonghua Li, Qian Li, Zhiguo Zheng, Haimiao Xu, Min Chen, Peng G. Wang, Yingjie Wang, Binghui Shen, and Wen Yi. 2015. "O-GlcNAcylation of G6PD Promotes the Pentose Phosphate Pathway and Tumor Growth." *Nature Communications* 6:1–10.
- Reczek, Colleen R. and Navdeep S. Chandel. 2015. "ROS-Dependent Signal Transduction." *Current Opinion in Cell Biology*.
- Van Der Reest, Jiska, Sergio Lilla, Liang Zheng, Sara Zanivan, and Eyal Gottlieb. 2018. "Proteome-Wide Analysis of Cysteine Oxidation Reveals Metabolic Sensitivity to Redox Stress." *Nature Communications* 9(1).
- Ribatti, Domenico. 2018. "An Historical Note on the Cell Theory." *Experimental Cell Research* 364(1):1–4.
- Ristow, Michael and Kim Zarse. 2010. "How Increased Oxidative Stress Promotes Longevity and Metabolic Health: The Concept of Mitochondrial Hormesis (Mitohormesis)." *Experimental Gerontology* 45(6):410–18.
- Rodriguez-Rodriguez, Patricia, Emilio Fernandez, and Juan P. Bolaños. 2013. "Underestimation of the Pentose–Phosphate Pathway in Intact Primary Neurons as Revealed by Metabolic Flux Analysis." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33(12):1843–45.
- Ronchi, Juliana A., Tiago R. Figueira, Felipe G. Ravagnani, Helena C. F. Oliveira, Anibal E. Vercesi, and Roger F. Castilho. 2013. "A Spontaneous Mutation in the Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase Gene of C57BL/6J Mice Results in Mitochondrial Redox Abnormalities." *Free Radical Biology and Medicine* 63:446–56.
- Rossi, Meghan J. and Gulcin Pekkurnaz. 2019. "Powerhouse of the Mind: Mitochondrial Plasticity at the Synapse." *Current Opinion in Neurobiology* 57:149–55.
- San Martín, Alejandro, Sebastián Ceballo, Iván Ruminot, Rodrigo Lerchundi, Wolf B. Frommer, and Luis Felipe Barros. 2013. "A Genetically Encoded FRET Lactate Sensor and Its Use To Detect the Warburg Effect in Single Cancer Cells" edited by M. Jekabsons. *PLoS ONE* 8(2):e57712.
- Sandberg, Mats, Jaspal Patil, Barbara D'Angelo, Stephen G. Weber, and Carina Mallard. 2014a. "NRF2-Regulation

- in Brain Health and Disease: Implication of Cerebral Inflammation." *Neuropharmacology* 79.
- Sandberg, Mats, Jaspal Patil, Barbara D'Angelo, Stephen G. Weber, and Carina Mallard. 2014b. "NRF2-Regulation in Brain Health and Disease: Implication of Cerebral Inflammation." *Neuropharmacology*.
- Sanz, Alberto. 2016. "Mitochondrial Reactive Oxygen Species: Do They Extend or Shorten Animal Lifespan?" *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1857(8):1116–26.
- Sapcariu, Sean C., Tamara Kanashova, Daniel Weindl, Jenny Ghelfi, Gunnar Dittmar, and Karsten Hiller. 2014. "Simultaneous Extraction of Proteins and Metabolites from Cells in Culture." *MethodsX* 1:74–80.
- Schägger, Hermann and Kathy Pfeiffer. 2000. "Supercomplexes in the Respiratory Chains of Yeast and Mammalian Mitochondria." *The EMBO Journal* 19(8):1777–83.
- Schieber, Michael and Navdeep S. Chandel. 2014. "ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress." *Current Biology*.
- Schofield, Christopher J. and Peter J. Ratcliffe. 2004. "Oxygen Sensing by HIF Hydroxylases." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(5):343–54.
- Schousboe, A., H. M. Sickmann, L. K. Bak, I. Schousboe, F. S. Jajo, S. A. A. Faek, and H. S. Waagepetersen. 2011. "Neuron-Glia Interactions in Glutamatergic Neurotransmission: Roles of Oxidative and Glycolytic Adenosine Triphosphate as Energy Source." *Journal of Neuroscience Research* 89(12):1926–34.
- Schousboe, Arne, Susanna Scafidi, Lasse K. Bak, Helle S. Waagepetersen, and Mary C. McKenna. 2014. "Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes." *Advances in Neurobiology* 11:13–30.
- Schulz, Tim J., Kim Zarse, Anja Voigt, Nadine Urban, Marc Birringer, and Michael Ristow. 2007. "Glucose Restriction Extends Caenorhabditis Elegans Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress." *Cell Metabolism*.
- Seibenhener, Michael L. and Michael C. Wooten. 2015. "Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice." *Journal of Visualized Experiments* (96):e52434.
- Semenza, Gregg L. 2017. "Hypoxia-inducible Factors: Coupling Glucose Metabolism and Redox Regulation with Induction of the Breast Cancer Stem Cell Phenotype." *The EMBO Journal* 36(3):252–59.
- Sena, Laura A. and Navdeep S. Chandel. 2012. "Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species." *Molecular Cell* 48(2):158–67.
- Sharma, Jaswinder, Michael V Johnston, and Mir Ahamed Hossain. 2014. "Sex Differences in Mitochondrial Biogenesis Determine Neuronal Death and Survival in Response to Oxygen Glucose Deprivation and Reoxygenation." *BMC Neuroscience* 15:9.
- Sheng, Wen S., Shuxian Hu, Amy Feng, and R. Bryan Rock. 2013. "Reactive Oxygen Species from Human Astrocytes Induced Functional Impairment and Oxidative Damage." *Neurochemical Research* 38(10):2148–59.
- Shukla, Varsha, Santosh K. Mishra, and Harish C. Pant. 2011. "Oxidative Stress in Neurodegeneration." *Advances in Pharmacological Sciences*.
- Sies, Helmut. 2014a. "Role of Metabolic H₂O₂ Generation: Redox Signaling and Oxidative Stress." *Journal of Biological Chemistry* 289(13):8735–41.
- Sies, Helmut. 2014b. "Role of Metabolic H₂O₂generation: Redox Signaling and Oxidative Stress." *Journal of Biological Chemistry* 289(13):8735–41.
- Simon, P., R. Dupuis, and J. Costentin. 1994. "Thigmotaxis as an Index of Anxiety in Mice. Influence of Dopaminergic Transmissions." *Behavioural Brain Research* 61(1):59–64.
- Singh, Anju, Christine Happel, Soumen K. Manna, George Acquah-Mensah, Julian Carrerero, Sarvesh Kumar, Poonam Nasipuri, Kristopher W. Krausz, Nobunao Wakabayashi, Ruby Dewi, Laszlo G. Boros, Frank J. Gonzalez, Edward Gabrielson, Kwok K. Wong, Geoffrey Girnun, and Shyam Biswal. 2013. "Transcription Factor NRF2 Regulates MiR-1 and MiR-206 to Drive Tumorigenesis." *Journal of Clinical Investigation* 123(7):2921–34.
- Snow, Barry J., Fiona L. Rolfe, Michelle M. Lockhart, Christopher M. Frampton, John D. O'Sullivan, Victor Fung, Robin A. J. Smith, Michael P. Murphy, Kenneth M. Taylor, and Protect Study Group. 2010. "A Double-Blind,

- Placebo-Controlled Study to Assess the Mitochondria-Targeted Antioxidant MitoQ as a Disease-Modifying Therapy in Parkinson's Disease." *Movement Disorders* 25(11):1670–74.
- Storz, Jay F. and Grant B. McClelland. 2017. "Rewiring Metabolism under Oxygen Deprivation." *Science* 356(6335):248–49.
- Sun, Dayan, Bin Li, Ruyi Qiu, Hezhi Fang, Jianxin Lyu, Dayan Sun, Bin Li, Ruyi Qiu, Hezhi Fang, and Jianxin Lyu. 2016. "Cell Type-Specific Modulation of Respiratory Chain Supercomplex Organization." *International Journal of Molecular Sciences* 17(6):926.
- Taguchi, Keiko, Hozumi Motohashi, and Masayuki Yamamoto. 2011. "Molecular Mechanisms of the Keap1-Nrf2 Pathway in Stress Response and Cancer Evolution." *Genes to Cells* 16(2):123–40.
- Thanan, Raynoo, Shinji Oikawa, Yusuke Hiraku, Shiho Ohnishi, Ning Ma, Somchai Pinlaor, Puangrat Yongvanit, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata, Raynoo Thanan, Shinji Oikawa, Yusuke Hiraku, Shiho Ohnishi, Ning Ma, Somchai Pinlaor, Puangrat Yongvanit, Shosuke Kawanishi, and Mariko Murata. 2014. "Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 16(1):193–217.
- Thorpe, G. W., C. S. Fong, N. Alic, V. J. Higgins, and I. W. Dawes. 2004. "Cells Have Distinct Mechanisms to Maintain Protection against Different Reactive Oxygen Species: Oxidative-Stress-Response Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(17):6564–69.
- Togliatto, Gabriele, Giusy Lombardo, and Maria Felice Brizzi. 2017. "The Future Challenge of Reactive Oxygen Species (ROS) in Hypertension: From Bench to Bed Side." *International Journal of Molecular Sciences* 18(9):1988.
- Toledano, Michel B., Anne Gaëlle Planson, and Agnès Delaunay-Moisan. 2010. "Reining in H₂O₂ for Safe Signaling." *Cell* 140(4):454–56.
- Trevisiol, Andrea and Klaus Armin Nave. 2015. "Brain Energy Metabolism: Conserved Functions of Glycolytic Glial Cells." *Cell Metabolism* 22(3):361–63.
- Tunez, I. and A. Santamaria. 2009. "[Model of Huntington's disease induced with 3-nitropropionic acid]." *Revista de neurologia* 48(8):430–34.
- Tunez, Isaac, Inmaculada Tasset, Veronica Perez-De La Cruz, and Abel Santamaria. 2010. "3-Nitropropionic Acid as a Tool to Study the Mechanisms Involved in Huntington's Disease: Past, Present and Future." *Molecules (Basel, Switzerland)* 15(2):878–916.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. 1995. "A Novel Assay for Apoptosis. Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V." *Journal of Immunological Methods* 184(1):39–51.
- Vernadakis, Antonia. 1996. "Glia-Neuron Intercommunications and Synaptic Plasticity." *Progress in Neurobiology*.
- Vicente-Gutierrez, Carlos, Nicolás Bonora, Veronica Bobo-Jimenez, Daniel Jimenez-Blasco, Irene Lopez-Fabuel, Emilio Fernandez, Charlene Josephine, Gilles Bonvento, Jose A. Enriquez, Angeles Almeida, and Juan P. Bolaños. 2019. "Astrocytic Mitochondrial ROS Modulate Brain Metabolism and Mouse Behaviour." *Nature Metabolism* 1(2):201.
- Volkenhoff, Anne, Astrid Weiler, Matthias Letzel, Martin Stehling, Christian Klämbt, and Stefanie Schirmeier. 2015. "Glial Glycolysis Is Essential for Neuronal Survival in Drosophila." *Cell Metabolism* 22(3):437–47.
- Wang, Haolu, Run Zhang, Kim R. Bridle, Aparna Jayachandran, James A. Thomas, Wenzhu Zhang, Jingli Yuan, Zhi Ping Xu, Darrell H. G. Crawford, Xiaowen Liang, Xin Liu, and Michael S. Roberts. 2017. "Two-Photon Dual Imaging Platform for in Vivo Monitoring Cellular Oxidative Stress in Liver Injury." *Scientific Reports* 7(1):45374.
- Wang, Ruoxi, Wenjing Hao, Lang Pan, Istvan Boldogh, and Xueqing Ba. 2018. "The Roles of Base Excision Repair Enzyme OGG1 in Gene Expression." *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(20):3741–50.
- Weber, Bruno and L Felipe Barros. 2015. "The Astrocyte: Powerhouse and Recycling Center." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(12):a020396.
- Weber, Bruno and L. Felipe Barros. 2015. "The Astrocyte: Powerhouse and Recycling Center." *Cold Spring Harbor*

- Weissman, L., N. C. de Souza-Pinto, T. Stevnsner, and V. A. Bohr. 2007. "DNA Repair, Mitochondria, and Neurodegeneration." *Neuroscience* 145(4):1318–29.
- Wilems, Thomas, Sangamithra Vardhan, Siliang Wu, and Shelly Sakiyama-Elbert. 2019. "The Influence of Microenvironment and Extracellular Matrix Molecules in Driving Neural Stem Cell Fate within Biomaterials." *Brain Research Bulletin*.
- Will, Yvonne, James Hynes, Vladimir I. Ogurtsov, and Dmitri B. Papkovsky. 2007. "Analysis of Mitochondrial Function Using Phosphorescent Oxygen-Sensitive Probes." *Nature Protocols* 1(6):2563–72.
- Wirth, Eva K., Marcus Conrad, Jochen Winterer, Christian Wozny, Bradley A. Carlson, Stephan Roth, Dietmar Schmitz, Georg W. Bornkamm, Vincenzo Coppola, Lino Tessarollo, Lutz Schomburg, Josef Köhrle, Dolph L. Hatfield, and Ulrich Schweizer. 2010. "Neuronal Selenoprotein Expression Is Required for Interneuron Development and Prevents Seizures and Neurodegeneration." *The FASEB Journal* 24(3):844–52.
- Wolosker, Herman, Elena Dumin, Livia Balan, and Veronika N. Foltyn. 2008. "D-Amino Acids in the Brain: D-Serine in Neurotransmission and Neurodegeneration." *FEBS Journal* 275(14):3514–26.
- Woo, Dong Kyun, Paula D. Green, Janine H. Santos, Anthony D. D'Souza, Zenta Walther, W. David Martin, Brooke E. Christian, Navdeep S. Chandel, and Gerald S. Shadel. 2012. "Mitochondrial Genome Instability and ROS Enhance Intestinal Tumorigenesis in APCMin/+mice." *American Journal of Pathology* 180(1):24–31.
- Woolley, J. F., J. Stanicka, and T. G. Cotter. 2013. "Recent Advances in Reactive Oxygen Species Measurement in Biological Systems." *Trends in Biochemical Sciences* 38(11):556–65.
- Xu, Jingshu, Paul Begley, Stephanie J. Church, Stefano Patassini, Selina McHarg, Nina Kureishy, Katherine A. Hollywood, Henry J. Waldvogel, Hong Liu, Shaoping Zhang, Wanchang Lin, Karl Herholz, Clinton Turner, Beth J. Synek, Maurice A. Curtis, Jack Rivers-Auty, Catherine B. Lawrence, Katherine A. B. Kellett, Nigel M. Hooper, Emma R. L. C. Vardy, Donghai Wu, Richard D. Unwin, Richard L. M. Faull, Andrew W. Dowsey, and Garth J. S. Cooper. 2016. "Elevation of Brain Glucose and Polyol-Pathway Intermediates with Accompanying Brain-Copper Deficiency in Patients with Alzheimer's Disease: Metabolic Basis for Dementia." *Scientific Reports* 6(May):1–12.
- Yardeni, T., M. Eckhaus, and H. D. Morris. 2011. "Retro-Orbital_injections_in_mice Lab Animal 2011.Pdf." *Lab Anim (NY)* 40(5):155–60.
- Yoboue, Edgar Djaha, Roberto Sitia, and Thomas Simmen. 2018. "Redox Crosstalk at Endoplasmic Reticulum (ER) Membrane Contact Sites (MCS) Uses Toxic Waste to Deliver Messages." *Cell Death & Disease* 9(3):331.
- Yoo, Si-Eun, Liuji Chen, Ren Na, Yuhong Liu, Carmen Rios, Holly Van Remmen, Arlan Richardson, and Qitao Ran. 2012. "Gpx4 Ablation in Adult Mice Results in a Lethal Phenotype Accompanied by Neuronal Loss in Brain." *Free Radical Biology and Medicine* 52(9):1820–27.
- Young, David, Brandon Pedre, Daria Ezeriņa, Barbara De Smet, Aleksandra Lewandowska, Maria-Armineh Tossounian, Nandita Bodra, Jingjing Huang, Leonardo Astolfi Rosado, Frank Van Breusegem, and Joris Messens. 2019. "Protein Promiscuity in H₂O₂ Signaling." *Antioxidants & Redox Signaling* 30(10):1285–1324.
- Zala, Diana, Maria Victoria Hinckelmann, Hua Yu, Marcel Menezes Lyra Da Cunha, Géraldine Liot, Fabrice P. Cordelières, Sergio Marco, and Frédéric Saudou. 2013. "Vesicular Glycolysis Provides On-Board Energy for Fast Axonal Transport." *Cell* 152(3).
- Zegenhagen, Loreen, Chaitanya Kurhade, Nikolaus Koniszewski, Anna K. Överby, and Andrea Kröger. 2016. "Brain Heterogeneity Leads to Differential Innate Immune Responses and Modulates Pathogenesis of Viral Infections." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 30:95–101.
- Zhang, Jixiang, Xiaoli Wang, Vikash Vikash, Qing Ye, Dandan Wu, Yulan Liu, and Weiguo Dong. 2016. "ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016(Figure 1).
- Zhang, Juan and Jianwei Jiao. 2015. "Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis." *BioMed Research International* 2015:727542.
- Zhang, Y., K. Chen, S. A. Sloan, M. L. Bennett, A. R. Scholze, S. O'Keeffe, H. P. Phatnani, P. Guarnieri, C. Caneda, N.

Ruderisch, S. Deng, S. A. Liddel, C. Zhang, R. Daneman, T. Maniatis, B. A. Barres, and J. Q. Wu. 2014. "An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex." *Journal of Neuroscience* 34(36):11929–47.

Zhang, Yan Bo, Xiulian Wang, Edward A. Meister, Ke Rui Gong, Shao Chun Yan, Guo Wei Lu, Xun Ming Ji, and Guo Shao. 2014. "The Effects of CoCl₂ on HIF-1 α Protein under Experimental Conditions of Autoprogressive Hypoxia Using Mouse Models." *International Journal of Molecular Sciences* 15(6):10999–12.