



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Regulación del metabolismo neuronal. Papel de la actividad sináptica e implicación en la fisiopatología del síndrome de Leigh

Paula Tena Morraja

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

A microscopic image of neurons, likely from a brain, showing a dense network of cell bodies and branching processes. The neurons are stained with a green fluorescent dye, highlighting their intricate structure against a dark background.

Regulación del metabolismo neuronal. Papel de la actividad sináptica e implicación en la fisiopatología del síndrome de Leigh.

Tesis presentada por **Paula Tena Morraja**

Programa de Doctorado en Biomedicina, Universitat de Barcelona

2024



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultad de Biología

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Programa de Doctorado en Biomedicina

Regulación del metabolismo neuronal. Papel de la actividad sináptica e implicación en la fisiopatología del síndrome de Leigh

Memoria presentada por

[Paula Tena Morraja]

Para optar al grado de

Doctor/a por la Universitat de Barcelona

Doctorando/a

[Paula Tena Morraja]

Director/a

[Francesc X. Soriano]

Co-director/a

[Manuel Reina]

Tutor/a

[Francesc X. Soriano]

The background of the slide is a grayscale micrograph of neural tissue, showing a dense network of neurons with prominent cell bodies and branching processes.

AGRADECIMIENTOS

Desde bien pequeña siempre me ha apasionado la ciencia, en especial la neurociencia siempre ha despertado en mí una gran curiosidad y, mi curiosidad poco a poco ha ido creciendo hasta día de hoy. Cuando inicié mi carrera como investigadora era una joven entusiasta con muchísimas ganas de aprender y, es que, he de decir que durante este trayecto no solo me he formado como investigadora, sino que también he experimentado un gran crecimiento personal.

He aprendido que para que la ciencia sea posible es necesario un buen trabajo en equipo, por ello quiero agradecer a las personas que en conjunto han aportado algo para que se desarrolle esta tesis.

Primero de todo, agradezco a mi director y tutor de tesis, el Dr. Francesc X. Soriano, por implicarse en enseñarme durante todo este trayecto, guiándome y transmitiendo su conocimiento para formarme como investigadora.

También, agradezco a mi co-director, el Dr. Manuel Reina, por su diligencia y profesionalidad y por estar siempre dispuesto a ayudar en lo que hiciera falta.

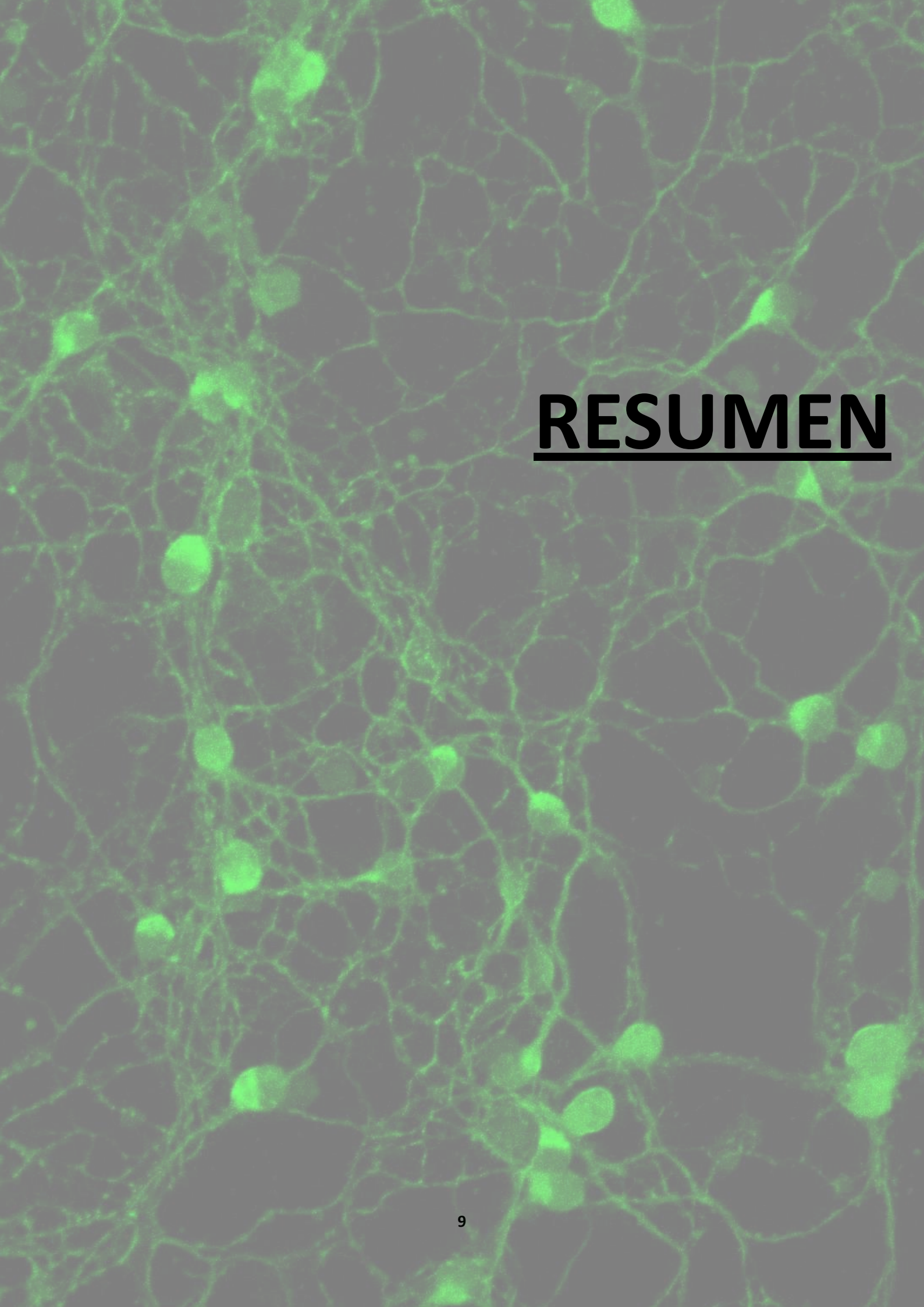
Sin duda, agradezco a todos los compañeros que me han ayudado, enseñado y acompañado durante estos años. Guillem, Raquel, Rosa, Marina, Sergi, Marc, Alejo y Aniol. Agradezco también a Ofelia, Jordi y Claudia. En especial a Claudia, quien gracias a su organización y experiencia como investigadora no solo ha sido una inspiración para mí, sino que también ha sido un gran apoyo moral.

Finalmente, en el ámbito personal, quiero agradecer a todas aquellas personas que han estado ahí para mí, escuchándome, animándome y confiando en mi cuando yo no lo hacía.

Gracias a mis padres, Celso y Gloria, a mi hermana, Sara, y a mi cuñado, Evans, de todo corazón por creer en mí y escucharme. Gracias a Pau por escucharme siempre, has sido el ancla que me mantenía a flote durante momentos difíciles. Gracias a mis amigos Andrea, Sergi, Lorena, Anna, Carla, Silvia, Ana, Bili y Javi por escucharme una y miles de veces hablar sobre el doctorado.

Por último, gracias a mis abuelos Dolores y Manolo y, Natalia y Celso. Dolores, durante la pandemia te fuiste y no pude despedirme. Siempre se me quedo algo atrapado en la garganta, por eso quiero dejar un poco de ti escrito aquí.

Me siento orgullosa de en quien me he convertido y aun más de haber tenido a todas estas personas a mi lado.

The background of the slide is a microscopic image of neural tissue. It shows a dense network of thin, dark, branching lines representing axons or dendrites. Scattered throughout this network are numerous bright green, oval-shaped structures, which appear to be fluorescently stained cells or nuclei. The overall texture is complex and organic.

RESUMEN

Most of the energy expenditure in the brain is used in processes related to synaptic transmission. Synaptic activity causes structural and functional adaptations in which synapses are potentiated, leading to an increase in the strength of these synapses and consequently also an increase in energy expenditure. Therefore, neurons with persistent synaptic activity must experience long-lasting bioenergetics remodeling to support increased activity-related energetic demand.

The results of this thesis show that synaptic activity increases mitochondrial bioenergetics beyond the duration of the synaptic activity by regulating neuronal iron metabolism at the transcriptional level with the consequent enhancement of cellular and mitochondrial iron uptake. Import into the mitochondria is necessary for heme and iron–sulphur cluster (ISC) synthesis, which are crucial for energy generation in mitochondria as they are required for respiratory chain complexes to function. Mechanistically, it was found that CREB induces the expression of the mitochondrial iron transporter Mfrn1, which is necessary for the activity-mediated bioenergetics boost.

Conversely, it was found that deregulated iron metabolism might participate in the pathophysiology of Leigh Syndrome. Leigh Syndrome (LS) is a severe and progressive mitochondrial disease characterized by symmetrical brain lesions, motor and respiratory deficits, and death at an early age. Analysis of brainstem samples from both presymptomatic and symptomatic Ndufs4 KO mice, which recapitulates the human Leigh Syndrome pathology, revealed alterations in iron metabolism and anti ferroptosis gene expression that results in increased lipidic peroxidation, a hallmark of ferroptosis.

To identify novel cellular pathways underlying the pathogenesis of LS, it was conducted an analysis of cell signalling triggers modified by cannabidiol (CBD), whose administration extends lifespan and improves clinical signs in Ndufs4 KO mice. CBD treatment diminishes lactate release in an AKT-dependent manner by reducing glucose uptake and normalizing the ratio of LDHA/LDHB expression, which is altered in Ndufs4 KO mice.

These findings advance in our understanding of metabolic adaptations in both physiological and pathological conditions, offering insights for potential therapeutic interventions.



ÍNDICE DE **CONTENIDOS**

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	9
ÍNDICE.....	13
ABREVIATURAS	21
INTRODUCCIÓN.....	29
1. Bioenergética y metabolismo mitocondrial	31
1.1. Estructura y funciones de las mitocondrias	31
1.2. Implicación de las mitocondrias en la bioenergetica neuronal	38
1.3. La señalización retrograda mitocondrial.....	40
1.3.1. PPAR.....	46
1.4. Las enfermedades mitocondriales primarias	49
1.4.1. El síndrome de Leigh	51
2. El metabolismo del hierro en el sistema nervioso.....	55
2.1. El Hierro en condiciones patológicas: ferroptosis.....	58
3. El metabolismo de la glucosa en el sistema nervioso.....	60
3.1. Transporte y metabolismo de la glucosa en el sistema nervioso	61
3.2. Otras vías metabólicas implicadas en la producción de energía	65
3.3. Transporte y metabolismo del lactato en el sistema nervioso	67
4. El cannabidiol.....	72
OBJETIVOS.....	77
MATERIALES Y MÉTODOS	81
1. Modelos animales.....	83
1.1. Ratas.....	83
1.2. Ratones	83
1.2.1. Mantenimiento de la colonia	84
1.2.2. Genotipado.....	85
2. Cultivos primarios	87
2.1. Preparación del coating.....	87
2.2. Preparación de medios y soluciones utilizadas.....	88
2.3. Cultivos primarios de neuronas corticales de embriones de rata	89
2.4. Cultivos primarios de neuronas de ratones posnatales.....	91
2.5. Cultivos primarios de astrocitos y microglía de ratones posnatales.....	94
2.6. Tratamiento con el inhibidor de la mitosis “AraC”	96
2.7. Estimulación de la actividad sináptica	96
3. Cultivos de líneas celulares	97
3.1. Líneas celulares	98
3.2. Preparación de medios	98
3.3. Manipulación de células	99
4. Técnicas de manipulación de ADN.....	101
4.1. Transformación de bacterias competentes.....	101
4.2. Amplificación de DNA plasmídico	102
4.3. Extracción y purificación de ADN plasmídico.....	103
4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”).....	104

4.5.	Electroforesis en gel de agarosa.....	104
4.6.	Clonación de ADN	106
4.7.	Secuenciación.....	109
4.8.	Transfección celular transitoria	110
5.	Infección con virus adeno-asociados (AAVs).....	112
5.1.	Amplificación de AAVs.....	112
5.2.	Extracción, purificación y concentración de AAVs	114
5.3.	Protocolo de infección	115
6.	Análisis de expresión génica	115
6.1.	Aislamiento de ARN a partir de tejido.....	116
6.1.1.	Aislamiento del tejido	116
6.1.2.	Aislamiento de RNA mediante el método fenol-cloroformo	116
6.1.3.	Limpieza y purificación de RNA	117
6.2.	Aislamiento de ARN a partir de cultivos celulares	117
6.3.	Síntesis de ADNc.....	118
6.4.	Reacción de qPCR.....	119
7.	Análisis de la actividad transcripcional	121
8.	Western blot	122
8.1.	Extracción de proteína de tejidos	122
8.2.	Extracción de proteína a partir de cultivos celulares	123
8.3.	Electroforesis SDS-PAGE	123
8.4.	Transferencia de proteínas a la membrana	125
8.5.	Bloqueo de la membrana	126
8.6.	Inmunodetección	126
8.7.	Borrado de la membrana	127
8.8.	Densitometría	127
9.	Zimografía	128
10.	Técnicas espectrofotométricas de absorción molecular	130
10.1.	Medida de los niveles de lactato en el medio	131
10.2.	Medida de los niveles de hierro	133
10.3.	Cuantificación de proteína	134
11.	Técnicas espectrofotométricas de fluorescencia	134
11.1.	Medida de los niveles de peroxidación lipídica	135
11.2.	Medida de los niveles de grupo hemo	137
11.3.	Medición de la Tasa de consumo de oxígeno	138
12.	Técnicas de luminiscencia	139
12.1.	Medida de los niveles de ATP	140
12.2.	Medida de los niveles de NAD ⁺ /NADH	140
13.	Separación celular por citometría de flujo	141
14.	Microscopía de campo claro y de contraste de fases	142
14.1.	Seguimiento, viabilidad de cultivos celulares	143
14.2.	Contaje de cultivos celulares	143
15.	Microscopía de fluorescencia y confocal	144
15.1.	Fijación de muestras con paraformaldehído	145
15.2.	Inmunofluorescencia	145
15.3.	Análisis de viabilidad	147
15.4.	Potencial de membrana mitocondrial	147
15.5.	Medidas de Ca ²⁺	148

15.6.	Mediciones del consumo de glucosa celular	150
15.7.	Medición de los niveles de hierro intracelular	150
16.	Análisis estadístico	153
17.	Materiales, reactivos, kits y equipos utilizados	153
17.1.	Medios de cultivo celular y suplementos	153
17.2.	Soluciones tampón	155
17.3.	Enzimas, reactivos químicos y productos varios	156
17.4.	Plásmidos	159
17.5.	Anticuerpos	160
17.6.	Primers	161
17.7.	Kits	163
17.8.	Equipos	163
RESULTADOS		167
1.	La actividad sináptica regula el metabolismo del hierro mitocondrial para mejorar la bioenergética neuronal	169
1.1.	La actividad sináptica incrementa los niveles de Fe ²⁺ intracelular	169
1.2.	El aumento de los niveles de hierro intracelular en las neuronas activas participa en el incremento de la capacidad bioenergética	170
1.3.	La actividad sináptica induce la expresión transcripcional de genes del metabolismo del hierro	171
1.4.	La disminución de MFRN1 perjudica la bioenergética mitocondrial	173
1.5.	CREB regula la expresión de MFRN1	175
1.6.	La actividad sináptica protege de la muerte celular por exceso de hierro	176
2.	La falta de la subunidad NDUFS4 del complejo I mitocondrial provoca alteraciones en el metabolismo del hierro	179
2.1.	La falta de la subunidad NDUFS4 del complejo I mitocondrial altera la expresión de genes implicados en el metabolismo del hierro	179
2.2.	La falta de la subunidad NDUFS4 del complejo I mitocondrial altera la expresión de proteínas clave en la homeostasis del hierro	180
2.3.	La falta de la subunidad NDUFS4 del complejo I mitocondrial incrementa la peroxidación lipídica	181
2.4.	La falta de la subunidad NDUFS4 del complejo I mitocondrial reduce la expresión de genes implicados en la defensa contra la ferroptosis	182
3.	Regulación de la SRM por el CBD en neuronas NDUFS4-KO	183
3.1.	El CBD no modifica la bioenergética mitocondrial en neuronas NDUFS4-KO	184
3.2.	El CBD no altera los niveles de calcio mitocondrial en neuronas NDUFS4-KO	185
3.3.	El CBD disminuye el flujo glucolítico en neuronas NDUFS4-KO	186
4.	Neuronas NDUFS4-KO estimulan el flujo glucolítico	187
4.1.	La falta de la subunidad NDUFS4 del complejo I mitocondrial incrementa la liberación de lactato	187
4.2.	Neuronas NDUFS4-KO promueven la captación de glucosa	188
4.3.	Ratones NDUFS4-KO presentan niveles elevados de HIF-1a	189
4.4.	Neuronas NDUFS4-KO estimulan la expresión de genes implicados en el transporte y el metabolismo de la glucosa	190

4.5.	La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial estimula la expresión de genes implicados en el metabolismo del lactato	191
4.6.	La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial promueve la formación de isoenzimas implicadas en la síntesis de lactato	193
4.7.	La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial estimula la expresión de genes implicados en el transporte del lactato	195
4.8.	La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial provoca modificaciones postraduccionales asociadas al aumento de la glucólisis	196
5.	El CBD regula la vía AKT en neuronas NDUF54-KO	199
5.1.	La inhibición de la vía AKT disminuye la liberación de lactato en neuronas NDUF54-KO	199
5.2.	El CBD regula el metabolismo de la glucosa en las neuronas NDUF54-KO	200
5.3.	El CBD regula la expresión de LDHA Y LDHB en neuronas NDUF54-KO	201
5.4.	El CBD disminuye la captación de glucosa en neuronas NDUF54-KO	203
5.5.	El CBD disminuye la lactilación en neuronas NDUF54-KO.....	204
6.	El agonista de PPAR γ regula el metabolismo del lactato en neuronas NDUF54-KO	205
6.1.	La actividad de PPAR γ se ve reducida en neuronas NDUF54-KO	205
6.2.	La rosiglitazona recupera la actividad de PPAR γ reducida en neuronas NDUF54-KO.....	206
6.3.	La RSG disminuye el flujo glucolítico en neuronas NDUF54-KO.....	207
6.4.	La RSG disminuye la lactilación en neuronas NDUF54-KO	209
6.5.	La rosiglitazona normaliza el MMP reducido en neuronas NDUF54-KO ...	210
6.6.	El redireccionamiento de sustratos a las mitocondrias recupera el potencial de membrana mitocondrial en neuronas NDUF54-KO	211
DISCUSIÓN.....		215
1.	La actividad sináptica regula el metabolismo del hierro mitocondrial para mejorar la bioenergética neuronal	217
2.	La deficiencia de NDUF54 altera el metabolismo del hierro celular contribuyendo a la peroxidación lipídica.....	220
3.	El CBD regula el metabolismo de la glucosa mediante la vía AKT en neuronas NDUF54-KO.....	223
4.	La RSG restaura los niveles de lactato y normaliza el MMP en neuronas NDUF54-KO	227
CONCLUSIONES		233
BIBLIOGRAFÍA.....		239
ANEXO: PUBLICACIONES.....		289

ABREVIATURAS

2-AG: 2-araquidonoilglicerol
 2-NBDG: 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxiglucosa
 4-AP: 4-Aminopiridina
 AAVs: virus adeno-asociados
 AEA: araquidonoiletanolamida
 AGE: glicación avanzada
 ALT: alanina transaminasa
 APS: persulfato amónico
 AraC: arabinósido de citosina
 ATP: trifosfato de adenosina
 BBB: barrera hematoencefálica
 Bic: bicucullina
 BPY: 2,2'-Bipyridyl 100 μ M
 BS: Tronco del encéfalo
 BSA: albúmina sérica bovina
 CB: Cerebelo
 CB1: receptores cannabinoides presináptico 1
 CB2: receptores cannabinoides presináptico 2
 CBD: Cannabidiol
 CBP: proteína de unión a CREB
 CCCP: carbonil cianida 3-clorofenilhidrazona
 CHX: cicloheximida
 CRE: elemento de respuesta a AMP cíclico
 CREB: proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico
 D-la: D-lactato
 Da: daltons
 DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol
 DcytB: enzima ferriredutasa citocromo B duodenal ()
 DHAP: dihidroxiacetona fosfato
 DIV: días in vitro
 DM: medio de disociación
 DMEM: dulbecco's Modified Eagle Medium
 DMSO: dimetil sulfóxido
 DMT1: transportador de metal divalente 1
 DNA: ácido desoxirribonucleico
 ECB: endocannabinoides
 EM: enfermedades mitocondriales primarias
 ETC: cadena de transporte de electrones
 FAAH: amida hidrolasa de ácido graso
 FBS: suero Fetal Bovino
 Fe²⁺: hierro ferroso
 Fe³⁺: hierro férrico
 Fluo-4: Fluo-4, AM, cell permeant
 Fpn: transportador de ferroportina
 FSK: forskolina
 Ft: ferritina
 FTH1: cadena pesada de ferritina

FTMT: ferritina mitocondrial
 FTL: cadena ligera de ferritina
 G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
 GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
 GFAT: L-glutamina D-fructosa-6-fosfatoamidotransferasa
 Glc-6-P: glucosa-6-fosfato
 GLS: glutaminasa
 GLUT: transportador de glucosa
 GPx: las glutatión peroxidasas
 GPX4: glutatión peroxidasa-4
 GR: glutatión reductasa
 GS: glicógeno sintasa
 GSH: glutatión
 GSSG: disulfuro de glutatión
 HAT: histona acetiltransferasa
 HBSS: hanks' Balanced Salt Solution
 HDAC: histonas desacetilasas
 HEPH: ferroxidasa hefestina
 HIF: factor inducible por hipoxia
 HIF-1 α : factor inducible por hipoxia-1 α
 HKII: hexokinase II
 HRE: elemento de respuesta a hipoxia
 HRP: peroxidasa de rábano
 IMM: membrana mitocondrial interna
 ITS: solución Insulina-Transferrina-Selenio-Etanolamina
 ISC: grupos hierro-azufre
 KyMg: ácido quinurénico
 L-Gln: L-Glutamina
 L-la: l-lactato
 LDH: lactato deshidrogenasa
 LIP: hierro lábil
 LLS: síndrome similar a Leigh
 LS: síndrome de Leigh
 MAGL: lipasa monoacilglicerol
 MCT: transportador de monocarboxilatos
 MCU: uniportador mitocondrial de calcio
 MDA: malondialdehído
 MEM: minimum Essential Medium
 MFRN1: mitoferrin 1
 MFRN2: mitoferrin 2
 mGlu-R: receptores metabotrópicos de glutamato postsinápticos
 MMP: Potencial de membrana mitocondrial
 MMI: membrana mitocondrial interna
 mRNA: RNA mensajero
 NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
 NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
 NBA: neurobasal A Medium

NBT: nitro blue Tetrazolium Chloride
 NDUFS4: subunidad S4 de la ubiquinona oxidoreductasa mitocondrial
 NDUFS4-KO: genotipo homocigoto knockout para la subunidad NDUFS4
 NMDA: N-metilo D-aspartato
 NSC: células madre neuronales
 OCR: Tasa de consumo de oxígeno
 OXPHOS: fosforilación oxidativa mitocondrial
 P/E: penicilina/Estreptomicina
 PARilación: poli-ADP-ribosilación de proteínas
 Pb: pares de bases
 PBS: tampón fosfato salino
 PDH: piruvato deshidrogenasa
 PDK1: piruvato deshidrogenasa quinasa 1
 PEP: fosfoenolpiruvato
 PFA: paraformaldehído
 PFK1: fosfofructoquinasa-1
 PFKFB: 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa
 PK: piruvato quinasa
 PL: poli-D-Lisina
 PLOH: alcoholes fosfolípidos
 PLOOH: hidroperóxidos de fosfolípidos
 PMS: phenazine methosulfate
 PPAR: proliferadores de peroxisomas
 PPARγ: receptor gamma activador de la proliferación de peroxisomas
 PPP: vía de las pentosas fosfato
 PPRE: elemento de respuesta al proliferador de peroxisomas
 Prx: peroxiredoxinas
 PTPm: poros de transición de la permeabilidad mitocondrial
 PUFA: ácidos grasos poliinsaturados
 PVDF: difluoruro de poli-vinileno
 Pyr: piruvato sódico
 RLU: unidades relativas de luz
 RNA: ácido Ribonucleico
 ROI: área de interés
 ROS: especies reactivas de oxígeno
 RSG: rosiglitazona
 RXR: receptor de retinoide X
 shRNAs: *short hairpin* RNAs
 SNC: sistema nervioso central
 SOD2: Superóxido dismutasa 2
 SOD1: Superóxido dismutasa 1a mitocondrial
 SRM: señalización retrógrada mitocondrial
 TAE: tampón Tris-Acetato-EDTA
 TBA: ácido tiobarbitúrico
 TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
 TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
 Tf: transferrina

TFRC1: receptor de transferrina
TMITS: medio de transfección
TMO: medio bajo soporte trófico
TMRM: tetramethylrhodamine methylester
Trx: tioredoxina-2
U.A.: unidades arbitrarias
VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje
WT: genotipo homocigoto Wild-type

INTRODUCCIÓN

1. Bioenergética y metabolismo mitocondrial

1.1. Estructura y funciones de las mitocondrias

La teoría endosimbiótica de Lynn Margulis publicada en 1967 y aceptada actualmente defiende que la célula eucariota se formó a partir de la endosimbiosis de células procariotas primitivas [1, 2]. Esta teoría nace a partir de las aportaciones de diferentes científicos. En 1883 Andreas Schimper observó que los cloroplastos tenían muchas características similares a las cianobacterias, pero no fue hasta el 1909 que Konstantin Mereschkowsky desarrollara y publicara la idea de la simbiogénesis y, más adelante, Ivan Wallin y Paul Portier plantearon la idea de que las mitocondrias también podían tener un origen endosimbiótico [3, 4, 5].

Las mitocondrias fueron descritas por primera vez por el histólogo alemán Richard Altmann en 1890 [6] y años después, en los años cincuenta, George Palade y Fritjof Sjöstrand gracias a las técnicas de microscopía electrónica revelaron distintos elementos estructurales de estos orgánulos, como que están formados por una membrana externa, una membrana interna y unos pliegues de membrana conocidos como crestas mitocondriales (Figura 1) [7].

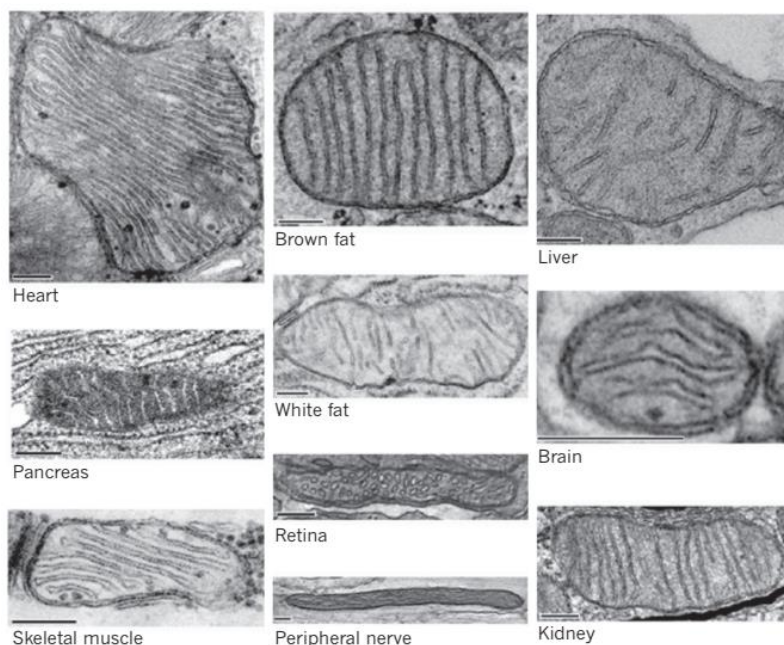


Figura 1. Fotografías electrónicas de mitocondrias de varios tejidos celulares (barra de escala, 200 nm). Imagen extraída de (Vafai SB, and Mootha VK, 2012) [8].

La arquitectura de doble membrana y el espacio intermembranoso que las separa permite que se desarrollen en la célula los procesos bioquímicos más importantes como es la producción de ATP. En la membrana externa se encuentran gran variedad de proteínas que participan tanto en la regulación de la dinámica mitocondrial como en el intercambio de gran variedad de moléculas, entre ellas se encuentra el canal aniónico dependiente de voltaje VDAC o porina, una proteína que permite el paso de iones y moléculas pequeñas de <5KDa. A pesar del flujo de metabolitos a través de la membrana externa, la impermeabilidad de la membrana interna a iones y moléculas con polaridad impide el paso de estos a la matriz mitocondrial, generando así un potencial de membrana (MMP) al cargarse positivamente el espacio intermembranoso. Y, es en las crestas generadas por las invaginaciones de la membrana interna, que se encuentran los complejos respiratorios funcionales y la ATP sintasa, además de las proteínas para el ensamblaje de los grupos sulfuro-hierro, donde se produce la síntesis de ATP y la fosforilación oxidativa. Gracias a la carga negativa propia de la matriz se fomenta la producción de ATP al generar una diferencia de potencial con la carga positiva del espacio intermembranoso [9, 10]. Estos orgánulos presentan una morfología dinámica definida por unas proteínas que se encargan de regular los diferentes mecanismos de fusión, fisión, mitofagia, movimiento y biogénesis mitocondrial [11]. La heterogeneidad morfológica comúnmente observada bajo microscopia electrónica de aspecto tubular o granulado varía en función de los requerimientos energéticos de la célula [8, 12].

Se considera a las mitocondrias orgánulos semiautónomos ya que en su matriz albergan múltiples copias de un genoma circular (DNAm_t) propio y una maquinaria de síntesis proteica con enzimas involucradas en el metabolismo de sustratos [10, 13]. Tienen un papel central en la homeostasis y la supervivencia celular, siendo su función principal la generación de la mayor parte de la energía que las células necesitan para funcionar correctamente [14]. Las mitocondrias generan ATP a partir de la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS), el ciclo de krebs y la β -oxidación de ácidos grasos. La cadena de transporte de electrones (ETC) está formada por cuatro complejos proteicos ubicados en la membrana interna mitocondrial. NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I), succinato-ubiquinona oxidoreductasa (complejo II), coenzima Q reductasa (complejo III) y el complejo citocromo c oxidasa (complejo IV) (Figura 2). Los electrones pasan a través

de ellos con la ayuda de los propios transportadores de electrones, la ubiquinona (Q), el citocromo c y las proteínas hierro-azufre. La transferencia de electrones produce una reacción exérgica que permite que los complejos I, III y IV bombeen protones (H^+) desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranoso, generando un MMP. La fuerza protón-motriz generada por este gradiente electroquímico permite que los protones bombeados al espacio intermembranoso fluyan pasivamente de vuelta a la matriz mitocondrial, a través de un poro para protones llamado ATP sintasa (complejo V). Y, este movimiento de protones a través del complejo V cataliza la conversión de ADP en ATP [10, 15]. Para proveer de electrones a la ETC es necesario que se generen moléculas NADH y FADH₂ mediante la oxidación de sustratos en la matriz mitocondrial (ciclo de Krebs o β -oxidación).

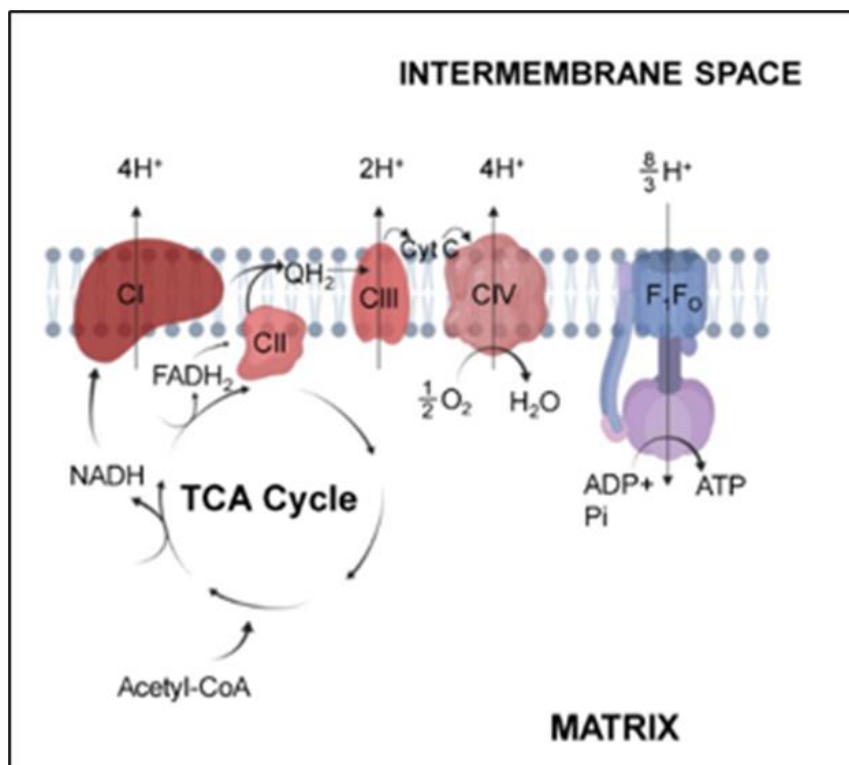


Figura 2. Imagen representativa de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Durante la OXPHOS, los electrones se transfieren desde los donantes de electrones, principalmente producidos en el ciclo de Krebs, a complejos mitocondriales de la cadena de transporte de electrones y, la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial se combina con el bombeo de protones (H^+) desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana para generar un gradiente electroquímico de protones que impulsa la síntesis de ATP. Imagen modificada y extraída de (Lewis, M. 2019) [16].

Además de la síntesis de ATP, las mitocondrias también desempeñan funciones clave en la síntesis de grupos hemo y hierro-azufre, la homeostasis del Ca^{2+} , la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la apoptosis [17].

Implicación de las mitocondrias en el metabolismo del hierro

Las mitocondrias desempeñan un papel vital en el metabolismo celular del hierro [18]. En 2006 se identificaron por primera vez las proteínas mitoferrin 1 (MFRN1) y mitoferrin 2 (MFRN2), involucradas en el transporte del hierro a las mitocondrias [19]. Estas proteínas pertenecen a la familia de portadores de solutos SLC25 y se expresan en la membrana mitocondrial interna (IMM) de las células eucariotas [19]. La MFRN1 (codificada por el gen SLC25A37) se expresa altamente en células eritroides diferenciadas, desempeñando un papel esencial en la biosíntesis del hemo, a diferencia de otros tejidos, donde se expresa en niveles más bajos. Por otro lado, la MFRN2 (codificada por el gen SLC25A28) se expresa de manera ubicua en tejidos no eritroides [20]. Además, se ha observado que en el transporte de hierro hacia las mitocondrias es más eficaz mediante MFRN1, ya que su vida media aumenta en el desarrollo de las células eritroides, en comparación con la vida media de la MFRN2, la cual no cambia [20]. Cuando la mitoferrina está desregulada, se observan condiciones patológicas, ya que la acumulación de hierro mitocondrial está estrechamente regulada por los niveles de mitoferrina dentro de la membrana mitocondrial [21, 22]. Se ha visto que MFRN1 es importante para el suministro de iones de hierro mitocondrial durante el metabolismo energético neuronal y la función cerebral adecuada [23].

Una vez dentro de la mitocondria el hierro se puede almacenar mediante la ferritina mitocondrial (FTMT) [24], una proteína de almacenamiento de hierro que pertenece a la familia de la ferritina, O bien, puede ser utilizado para la síntesis de grupos hemo y grupos hierro-azufre [25]. La FTMT se expresa principalmente en los testículos y el cerebro [26] y, se ha visto que puede tener una importante función protectora contra la toxicidad mediada por hierro al proteger las mitocondrias del daño oxidativo inducido por el hierro, presumiblemente a través del secuestro y la regulación de la distribución de hierro entre el citosol y el contenido mitocondrial [27,28].

-Síntesis de grupos hemo en las mitocondrias:

El proceso enzimático porfirinosíntesis, que lleva a cabo la producción del grupo hemo, se inicia con la síntesis de ácido δ -aminolevulínico (δ ALA) por la enzima ALA sintasa a partir de la condensación de la glicina y la succinil coenzima A proveniente del ciclo del ácido cítrico. El producto derivado de esta reacción se transporta al citoplasma. No obstante, actualmente aún se desconoce el mecanismo de transporte de la glicina y los productos intermedios a través de las membranas mitocondriales. Se proponen los transportadores solute carrier family 25, member 38 (SLC25A38) y ABCB10 como exportadores de ALA mitocondrial en la IMM [29,30]. Pero aún no se ha identificado el transportador ALA ubicado en la membrana mitocondrial externa. Una vez en el citoplasma, la deshidratasa de ALA forma porfobilinógeno a partir del δ ALA y la enzima desaminasa de PBG lo transforma en hidroximetilbilano. El hidroximetilbilano es un precursor inestable, por lo que rápidamente se cataliza su ciclación a uroporfirinógeno III mediante la uroporfirinógeno III sintasa y, seguidamente, la uroporfirinógeno III descarboxilasa cataliza la reacción a coproporfirinógeno III. El producto es transportado a la mitocondria por ABCB6 [31] donde la coproporfirinógeno III oxidasa lo convierte a protoporfirinógeno IX y la protoporfirinógeno oxidasa lo oxida hasta obtener protoporfirina IX. Sin embargo, el papel sigue de ABCB6 siendo controvertido [32, 33, 34]. Finalmente, la ferroquelatasa, asociada a MFRN1 y ABCB10 en la IMM, cataliza la inserción de un átomo ferroso en la protoporfirina IX y el producto final es el grupo hemo [35, 36]. Este hemo sintetizado es exportado de las mitocondrias por el transportador FLVCR1b (Figura 3) [37, 38, 39].

Estructuralmente el grupo hemo está compuesto por un ion Fe^{2+} (ferroso) contenido en el centro de un heterociclo orgánico llamado porfirina. Funciona como cofactor metálico en varias enzimas, entre las que se destacan las hemoproteínas que almacenan oxígeno (hemoglobinas), metabolizan el oxígeno (oxidases, peroxidases, catalasas e hidroxilasas) y transfieren electrones (citocromos) [35, 40]. Además de ser un cofactor esencial en la cadena de transporte de electrones actúa como regulador de la expresión de varios factores de transcripción [41] y participa en el control de canales iónicos de potasio activados por calcio [42].

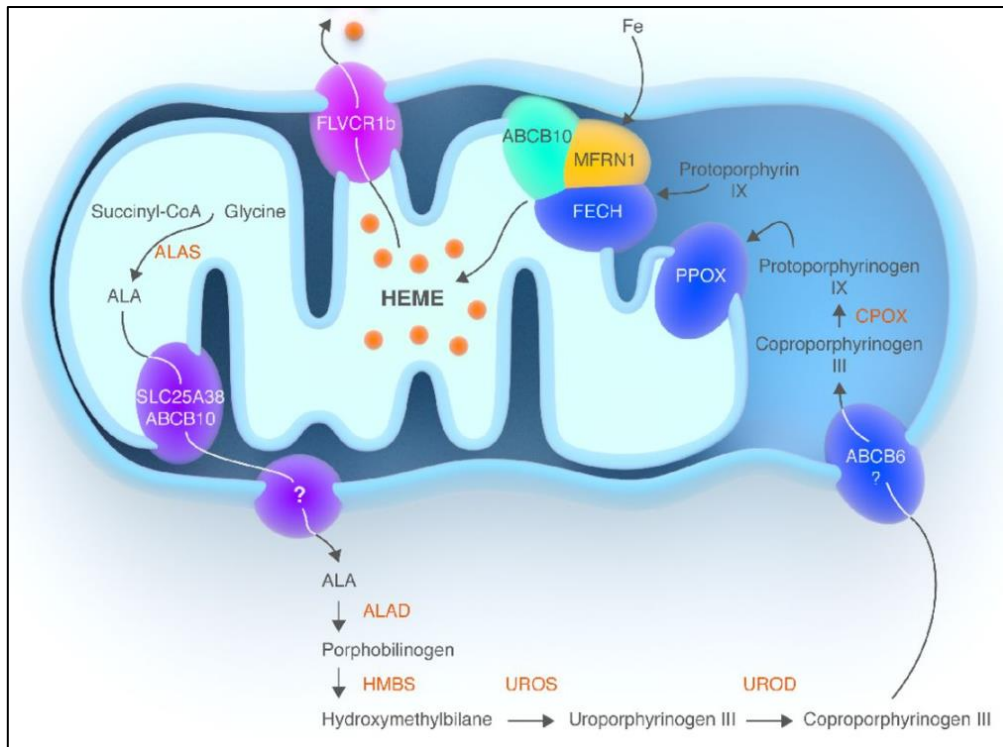


Figura 3. Biosíntesis del grupo hemo. La síntesis de hemo comienza con la condensación de succinyl-CoA y glicina para formar ALA. El ALA se convierte en CPgenIII mediante una serie de reacciones enzimáticas y este se oxida a PPIX. Finalmente, la ferroquelatasa incorpora el hierro ferroso al PPIX para formar hemo. Imagen extraída de (Mercurio, S., & Tolosano, E. 2014) [36].

-Síntesis de grupos hierro-azufre (ISC) en las mitocondrias:

Los ISC son estructuras bioquímicas compuestas por iones de hierro y azufre que se encuentran ligados a residuos de cisteína de algunas proteínas. Esos grupos prostéticos son necesarios para una amplia variedad de funciones proteicas (transferencia de electrones, catálisis enzimática y sensores metabólicos) [43]. Aunque existe una variedad de configuraciones, la disposición de los átomos de Fe en las proteínas Fe-S es tetraédrica (4Fe-4S) [43].

Para el ensamblaje de los ISC la enzima ISCU se une a la cisteína desulfurasa dimérica (NFS1) formando un homodímero en el que la enzima NFS1 proporciona el azufre necesario para la síntesis de ISC al eliminar el azufre de un aminoácido de cisteína, creando así alanina en el proceso [44,45]. Y, el azufre extraído se transfiere a la ISCU donde se une al Fe. Se desconoce como se suministra el Fe, aunque varios estudios proponen a la proteína frataxina como posible fuente de hierro [46].

Implicación de las mitocondrias en la homeostasis del Ca²⁺

El complejo uniportador mitocondrial de calcio (MCU), ubicado en la membrana interna mitocondrial, regula los niveles de calcio citoplasmático permitiendo su entrada a la mitocondria cuando su concentración citoplasmática es elevada [47, 48, 49]. Una vez dentro de las mitocondrias activa el piruvato deshidrogenasa, el isocitrato deshidrogenasa, la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [50, 51, 52], además de varios complejos de la cadena de transporte de electrones [53]. No obstante, grandes cantidades de Ca²⁺ producen la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm) [54] y se desencadena una respuesta de muerte celular por necrosis, ya que provoca la rápida disipación del MMP y, por lo tanto, la detención abrupta de la síntesis de ATP [55, 56]. Por lo tanto, para un correcto funcionamiento mitocondrial se requiere una captación precisa de Ca²⁺ y mantener los niveles de ATP y MMP estables [57], ya que la pérdida de su estabilidad es un indicador de disfunción mitocondrial [58].

Implicación de las mitocondrias en la generación de especies reactivas de oxígeno

Durante la fosforilación oxidativa tiene lugar la producción de ROS mitocondrial. La fuga de electrones en el complejo I y el complejo III de la cadena de transporte de electrones conduce a una reducción parcial de oxígeno para formar superóxido, el cual se dismuta rápidamente en peróxido de hidrógeno por dos dismutasas que incluyen superóxido dismutasa 2 (SOD2) en la matriz mitocondrial y superóxido dismutasa 1 (SOD1) en el espacio intermembranoso. A bajos niveles, las ROS actúan como moléculas de señalización frente a estímulos fisiológicos y patológicos, además, la célula posee mecanismos antioxidantes para eliminarlas [9]. Pero a altos niveles el superóxido y el peróxido de hidrógeno generados en este proceso pueden inducir daños importantes e irreversibles para las mitocondrias y las células al provocar la oxidación de lípidos y proteínas de la membrana mitocondrial [17, 59]. Dentro de las mitocondrias, el peróxido de hidrógeno es degradado por las glutatión peroxidasas (GPx) o las peroxiredoxinas (Prx), que dependen del glutatión (GSH) y la tiorredoxina-2 (Trx) para su reducción, respectivamente. El GSH se genera mediante la reducción del disulfuro de glutatión (GSSG) por la glutatión reductasa (GR) (Figura 4) [60, 61].

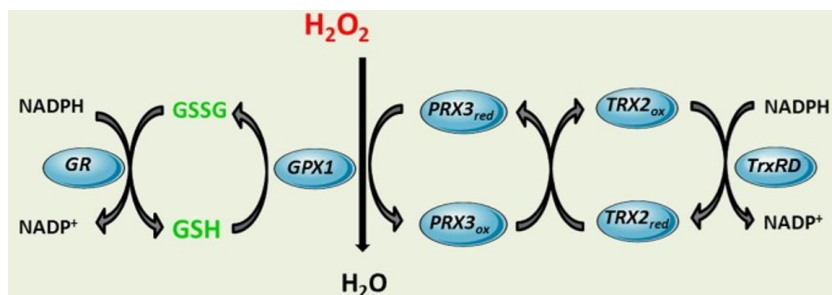


Figura 4. Esquema de los sistemas de defensa antioxidantes de la célula para eliminar las ROS. Imagen adaptada extraída de (Ribas, V, 2014) [61].

Implicación de las mitocondrias en la apoptosis

Tal como se comenta anteriormente, las mitocondrias también pueden regular la muerte celular controlada por apoptosis. La permeabilización de la membrana mitocondrial externa por proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak permite que proteínas mitocondriales apoptóticas como el citocromo c o SMAC/DIABLO pasen al citoplasma e inicien la activación de las caspasas y la muerte celular por apoptosis [62, 63].

1.2. Implicación de las mitocondrias en la bioenergética neuronal

El sistema nervioso central (SNC) está formado por un complejo sistema de neuronas que transmiten la información a través de señales químicas y eléctricas y, células gliales encargadas de mantener un equilibrio homeostático y mielinizar, complementar y proteger las neuronas. Anatómicamente está compuesto por el cerebro, el cerebelo, el tronco del encéfalo y la médula espinal y, se encarga de coordinar y controlar todas las funciones sensitivas y motoras que permiten a los seres humanos relacionarse con su entorno, mediante la estimulación de hormonas o enzimas [64].

El cerebro es el órgano del cuerpo que más energía demanda. Alrededor del 75% del gasto energético del cerebro se utiliza en procesos relacionados con la transmisión sináptica como el restablecimiento del equilibrio iónico o el reciclaje de neurotransmisores. Como consecuencia de la actividad sináptica se produce un aumento en el gasto de energía y, por lo tanto, se requiere un mayor suministro de ATP. La mayor parte del ATP generado en la neurona se produce por OXPHOS [65]. Durante la diferenciación y desarrollo neuronal, las neuronas llevan a cabo una reprogramación génica que requiere grandes cantidades de energía para sustentar la rápida formación de los largos axones y transportar eficientemente moléculas hasta sus terminaciones

(Figura 5) [66, 67]. Por lo tanto, las mitocondrias son especialmente necesarias en los terminales sinápticos de las neuronas pre-sinápticas y post-sinápticas para suministrar de ATP la célula y modular los incrementos citosólicos de Ca^{2+} y los filamentos de actina hacia el terminal axónico durante la actividad sináptica [68, 69]. De manera que, si las mitocondrias no funcionan correctamente, se observan alteraciones en la eficiencia de diferenciación de las neuronas durante la neurogénesis, así como en el crecimiento neurítico, afectando el estado fisiológico y funcional de estas durante el desarrollo y después del mismo [70-73].

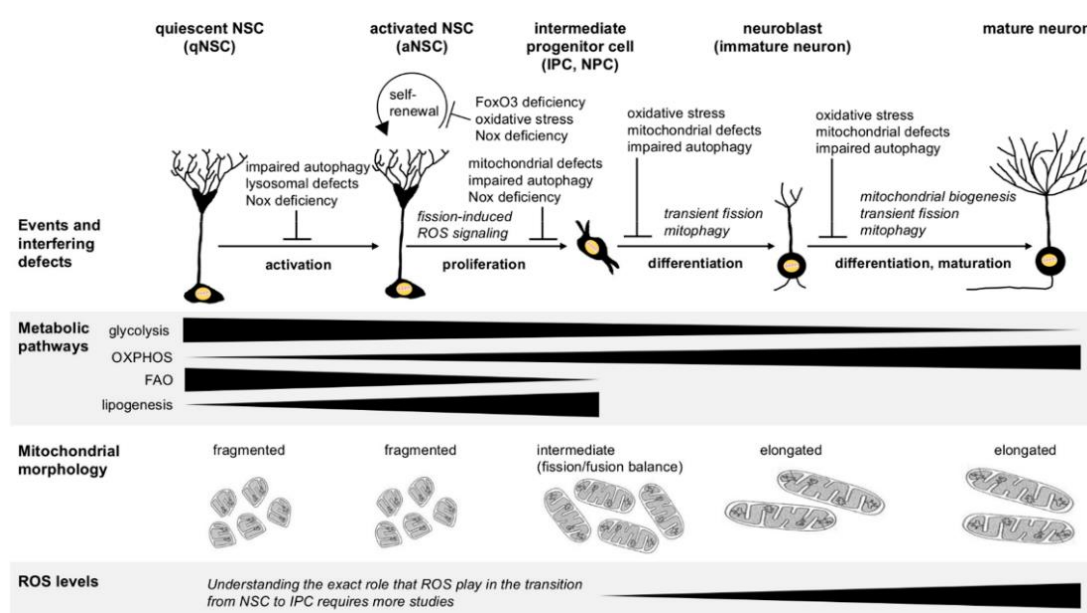


Figura 5. Esquema del metabolismo mitocondrial durante la neurogénesis adulta. Las células madre neuronales (NSC) dependen de la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos y, a medida que aumenta OXPHOS las células empiezan a diferenciarse en neuroblastos y progresan hasta convertirse en neuronas recién nacidas maduras. Imagen extraída de (Büeler H. 2021) [74].

La actividad sináptica y el resultante influjo de Ca^{2+} son mecanismos importantes que activan segundos mensajeros. Desde receptores sinápticos hasta vías de señalización como las de CaMK o las ERK1/2. La generación de cambios transitorios en los niveles de Ca^{2+} en el citoplasma se transduce en señales desde los receptores sinápticos hasta el núcleo celular, donde tiene lugar la estimulación de diferentes programas de transcripción de genes [75-77]. Algunos de estos genes parecen ser objetivos de CREB, un factor de transcripción clave en la regulación de la expresión génica mediante la

interacción con la secuencia conocida como elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE) [78].

Las diferentes cascadas de señalización iniciadas por la actividad sináptica dan como resultado la activación de CREB al fosforilar el residuo Ser-133 de los elementos CRE [78-82]. Tras su activación, CREB recluta a la proteína de unión a CREB (CBP) y p300 para aumentar su actividad transcripcional [83-85], ya que ambos son histona acetiltransferasas (HAT), capaces de catalizar la acetilación de la mayoría de histonas haciendo la secuencia génica más accesible a la transcripción [86]. Además, CBP ayuda estabilizando diferentes factores implicados en el inicio de la transcripción [85].

El papel de CREB es clave durante el desarrollo y la supervivencia neuronal [87]. Recientemente se ha observado que la actividad sináptica induce el metabolismo de la glucosa para suministrar lípidos para el crecimiento de neuritas al regular transcripcionalmente la expresión del transportador neuronal de glucosa Glut3 y las enzimas limitantes de la glucólisis (Figura 6) [88].

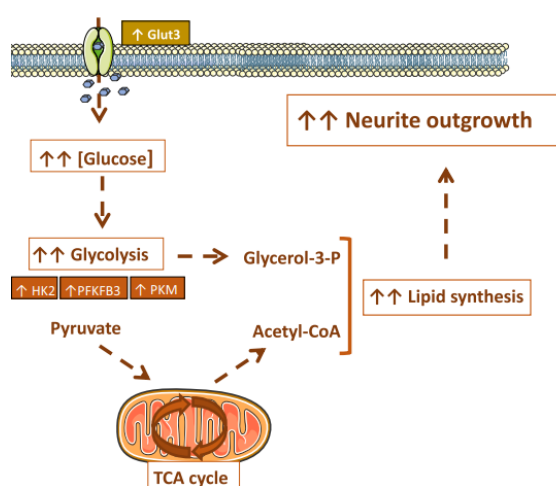


Figura 6. Modelo de actividad sináptica que induce el metabolismo de la glucosa para suministrar lípidos para el crecimiento de neuritas. Imagen extraída de (Segarra-Mondejar, M. 2018) [88].

1.3. La señalización retrograda mitocondrial

Las mitocondrias tienen la capacidad de cambiar su función, morfología y número en respuesta a condiciones fisiológicas y factores estresantes [89]. A pesar de que estos orgánulos contienen su propio genoma circular y su propia maquinaria de síntesis proteica, la mayoría de las proteínas clave para su función están codificadas por el genoma nuclear [90, 91]. La función mitocondrial adecuada es crucial para el

mantenimiento de la homeostasis metabólica y la activación de respuestas apropiadas al estrés [92]. Por lo que la comunicación entre la mitocondria y el núcleo es una parte esencial en la biogénesis y la bioenergética de este orgánulo [93-95].

Cuando la función mitocondrial se ve alterada da como resultado la activación de cascadas de señalización, en el que las mitocondrias envían señales al núcleo con el objetivo de desencadenar respuestas celulares adaptativas orquestadas por cambios coordinados en la expresión genética. Este mecanismo se le conoce como señalización retrógrada mitocondrial (SRM) y, ocurre en respuesta a perturbaciones metabólicas como niveles alterados de ROS, ATP/ADP/AMP, NAD⁺/NADH, Ca²⁺ y metabolitos mitocondriales, entre otros (Figura 7) [17, 96]. La SRM se describió por primera vez en 1993, al descubrir que los genes RTG1 y RTG2 de *Saccharomyces cerevisiae* regulaban la expresión del gen nuclear CIT2 en respuesta a la disfunción mitocondrial [97].

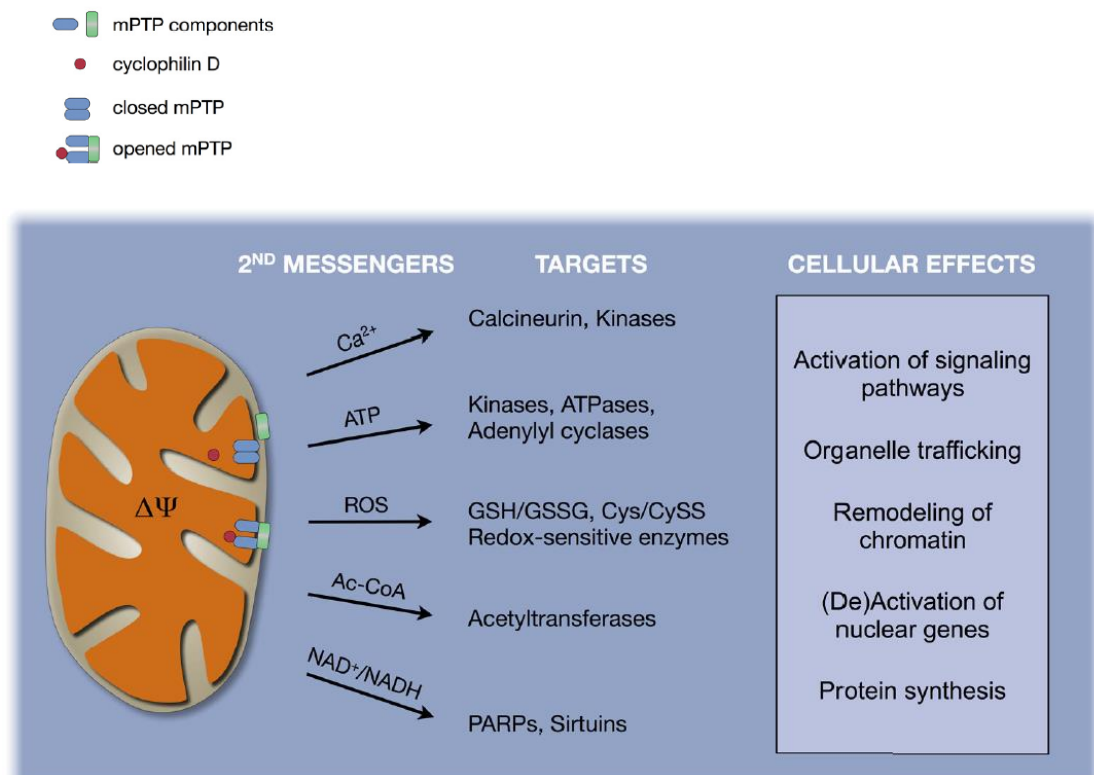


Figura 7. Sustratos de señalización retrógrada mitocondrial. La apertura irreversible del mPTP ocurre en respuesta a diversos factores estresantes celulares como el calcio de la matriz, la pérdida del potencial de membrana y ROS. En respuesta a la función mitocondrial se activan segundos mensajeros que producen influir en objetivos moleculares que inducen efectos celulares específicos

Existen múltiples vías que regulan la comunicación mitonuclear, en mamíferos se han estudiado varias vías de transducción de señal que actúan para restaurar la función mitocondrial y mantener la homeostasis celular, o bien, desencadenar la muerte celular por apoptosis en caso que el estrés mitocondrial perdure [93, 98]. Todo empieza con una homeostasis mitocondrial alterada, como es una reducción de ATP y un aumento de ROS y Ca^{2+} citosólico. Estos sustratos conducen a la activación de segundos mensajeros que pueden modular factores de transcripción específicos y alterar la expresión de genes nucleares [93]. Algunas de las señales por las que las mitocondrias comunican su estado funcional al núcleo son las siguientes:

La vía de respuesta a la proteína desplegada mitocondrial (UPRmt)

Las mitocondrias poseen su propio arsenal de chaperonas y proteasas. Cuando las proteínas desplegadas, mal plegadas o no ensambladas se acumulan más allá de su capacidad de plegado se genera un estrés que conduce a la disfunción mitocondrial. Por lo tanto, para mantener la homeostasis de proteínas mitocondriales las mitocondrias activan la vía UPRmt para comunicarse de manera retrograda con el núcleo. La UPRmt, mediante la activación de unos factores de transcripción concretos, incrementa la producción de chaperonas y proteasas mitocondriales para recuperar la capacidad de plegamiento y degradación de proteínas [99, 100].

Dado que las mitocondrias y el retículo endoplasmático están en constante contacto para regular funciones esenciales que mantengan el correcto funcionamiento de la célula [101], en respuesta a proteínas mal plegadas también se pueden activar las proteínas ancladas al retículo endoplasmático PERK, IRE1 y ATF6. Estas proteínas activan cascadas de señalización encargadas de activar factores de transcripción que median la expresión de mecanismos de pro-supervivencia. La proteína ATF6 actúa directamente como factor de transcripción, IRE1 permite que se traduzca el factor de transcripción Xbp1s y, PERK se encarga de fosforilar a $\text{eIF2}\alpha$ y activarlo, que a su vez reprime la traducción global de proteínas y facilita la expresión del factor de transcripción ATF4 [102]. Si el estrés persiste y es irreparable se desencadena el proceso de muerte celular mediante la activación de caspasas. El mecanismo no se conoce del todo, pero se conoce la vía pro-apoptótica en la que la proteína CHOP es expresada mediante el factor de transcripción ATF4 [103].

Efectos de la disfunción mitocondrial sobre la homeostasis del calcio

Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la amortiguación de los niveles de calcio intracelular. Por lo que la disfunción mitocondrial da como resultado un aumento de los niveles de calcio citosólico, ya que sólo las mitocondrias energizadas pueden captar iones Ca^{2+} [104]. El incremento de calcio citoplasmático activa quinasas y fosfatasas sensibles al calcio como la calcineurina, la PKC, CaMK IV y la MAPK/JNK [105].

Algunas de las vías que se activan en la SRM para regular la expresión génica son, la vía calcineurina/NFAT mediante unión de la calmodulina al calcio y, la vía CaMKIV, la cual mediante fosforilación activa el factor de transcripción nuclear CREB [106].

Efectos de la alteración del metabolismo mitocondrial en la regulación de la expresión génica: Alteración mitocondrial en la producción de ATP

La respiración mitocondrial defectuosa puede provocar una disminución en los niveles de ATP. El ATP es el sustrato principal para la fosforilación de proteínas (modificación postraducciona reversible involucrada en los procesos de transducción de señales y la regulación de una gran cantidad de enzimas) [107, 108] y para la síntesis del segundo mensajero AMPc, implicado en las vías de transducción de señales [109]. Además, la falta de ATP y el aumento de AMP y ADP activan directamente la AMPK, una proteína quinasa implicada en la regulación del metabolismo energético celular [110].

Efectos de la alteración del metabolismo mitocondrial en la regulación de la expresión génica: Alteración mitocondrial en la producción de NAD⁺

En el ciclo de Krebs el metabolismo de sustratos energéticos por enzimas reductasas hace que el NAD⁺ se reduzca a NADH para luego ser reoxidado a NAD⁺ mediante la NADH oxidorreductasa en el Complejo I del ETC. Por lo que la disfunción mitocondrial de OXPHOS da como resultado un aumento en los niveles de NADH [111]. En el citoplasma, el NAD⁺ sirve de sustrato para varias enzimas, incluidas las polimerasas poli ADP-ribosa, encargadas de la poli-ADP-ribosilación de proteínas (PARilación), y las sirtuinas, que incluyen las Sirtuinas desacetilasas de clase III, unas enzimas que desempeñan funciones importantes en la reparación del DNA, eventos de transducción de señales, remodelación de la cromatina y regulación de la expresión génica [112, 113].

La PARilación es una modificación proteica postraducciona reversible en respuesta al daño del DNA. Consiste en la síntesis de cadenas de poli-ADP-ribosa como señal para que otras enzimas se encarguen de la reparación o degradación del DNA [114].

Las sirtuinas son una familia de proteínas que se caracterizan por tener un dominio que contiene actividad catalítica y residuos de aminoácidos implicados en la unión de NAD⁺, un cosustrato metabólico. Estas proteínas exhiben actividad de proteína desacetilasa de histonas (HDACs) dependiente de NAD⁺ y actividad ADP-ribosiltransferasa [115, 116]. Las HDACs mediante la eliminación de grupos acetilo de residuos clave de lisina en la región N-terminal de las histonas H3 y H4 promueven la descompactación de regiones de cromatina, permitiendo así la accesibilidad de la actividad transcripcional a las regiones promotoras de los genes y, por lo tanto, su expresión [117]. Además, también regulan otras enzimas (Suv39h1, Ezh2, p300) o factores de transcripción (NF-κB, p53, FOXO, PGC-1α, Myc) asociados a vías implicadas en la regulación de la cromatina [118].

Los mamíferos contienen siete sirtuinas (SIRT1–7) que modulan distintas vías metabólicas y de respuesta al estrés. SIRT1, SIRT6 y SIRT7 se encuentran en el núcleo, SIRT2 es principalmente citosólico y SIRT3, SIRT4 y SIRT5 se encuentran en las mitocondrias [115, 116]. La SIRT3 es una de las desacetilasas más destacadas en las mitocondrias [119, 120]. Más del 60% de las proteínas mitocondriales contienen sitios de acetilación [121], y muchas de ellas participan en el metabolismo energético mitocondrial [122, 123]. SIRT3 promueve la función mitocondrial, mejora la producción de ATP, acelera la eliminación de ROS y mantiene la homeostasis metabólica mitocondrial al activar sustratos mediante desacetilación (Figura 8) [119]. Por ejemplo, se ha demostrado que SIRT3 puede reducir la carga celular de ROS al activar IDH2, SOD2 y CAT [124-126]. No obstante, SIRT3 se sintetiza como una proteína inactiva y necesita ser activada mediante la peptidasa de la matriz. PGC-1α se ha visto que puede estimular la expresión del gen SIRT3 [127]. Además, SIRT1 promueve la biogénesis mitocondrial mediante la desacetilación y activación de PGC-1α [128-130].

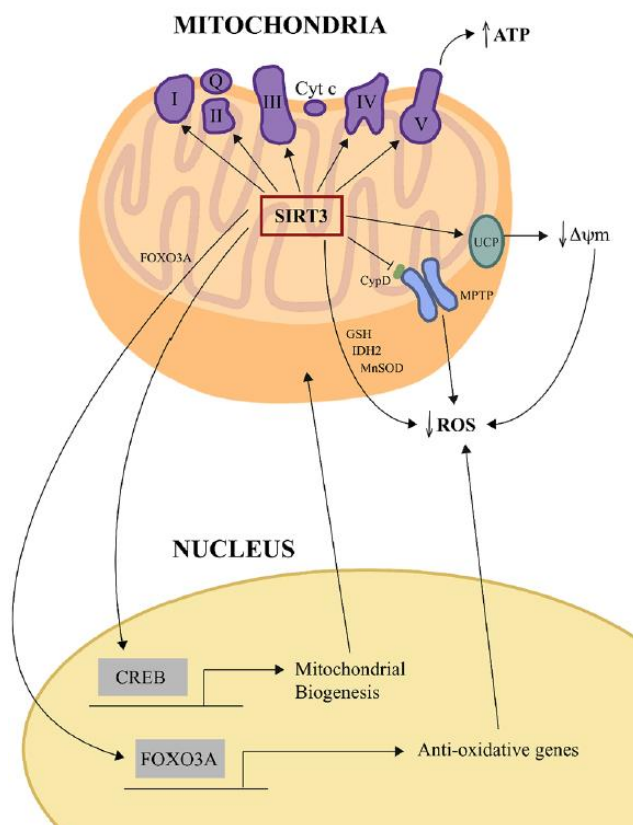


Figura 8. Funciones de SIRT3 en la mitocondria y el núcleo. SIRT3 influye en la fosforilación oxidativa y el estrés oxidativo al desacetilar y regular la actividad de los complejos mitocondriales y de enzimas involucradas en el estrés mitocondrial. SIRT3 también puede organizar la interacción mitocondria-núcleo al desacetilar y activar FOXO3A o el factor de transcripción CREB de manera indirecta y, activar la transcripción de genes antioxidantes o de biogénesis mitocondrial. Imagen extraída de (Sidorova-Darmos, E., Sommer, R., & Eubanks, J. H. (2018)) [131].

Efectos de la alteración de metabolitos mitocondriales en la regulación de la expresión genética

La producción alterada de ciertos metabolitos mitocondriales como el fumarato, el succinato y otros intermediarios del ciclo de Krebs se han visto involucradas en la regulación de genes nucleares a través de modificaciones epigenéticas de histonas, desmetilasas de DNA, prolil-hidroxilasas y otras enzimas dioxigenasas [132-135]. Además, se ha demostrado que el fumarato estabiliza el factor inducible por hipoxia (HIF) al reaccionar covalentemente con glutatión [136].

Otro ejemplo es la Ac-CoA, que después de ser metabolizada por las mitocondrias es transportada al citoplasma, donde puede ingresar al núcleo y ser utilizada como sustrato para la acetilación de la lisina de histonas por las proteínas acetiltransferasas [137, 138]. La acetilación de proteínas son modificaciones postraduccionales que modulan así las vías de señalización celular y la expresión génica, ya que definen la función de coactivadores transcripcionales, factores de transcripción, e histonas implicadas en la remodelación de la cromatina, entre otras [138, 139].

Efectos de la producción de ROS en la regulación de la expresión genética

Existen numerosos mecanismos por los cuales los niveles de ROS mitocondrial pueden alterar la señalización celular. Por ejemplo, niveles alterados de ROS pueden oxidar grupos tiol en residuos de cisteína de algunas proteínas [140, 141]. Como es el caso de algunas fosfatasa celulares como MAPK [142] y el supresor de tumores PTEN [143]. Además, los niveles de ROS mitocondriales son capaces de modular la señalización celular a través de la estabilización de las subunidades de HIF-1 [144-146]. El aumento en los niveles de HIF permite modular la respiración mitocondrial mediante la inducción de genes como el piruvato deshidrogenasa quinasa-1 (PDK1) que inhibe la conversión de piruvato en acetilCoA para alimentar el ciclo de Krebs y proporcionar agentes reductores para OXPHOS [147, 148]. También se ha visto que ROS activa la señalización de NF- κ B [149], el factor de transcripción Nrf2 [150] y regula la activación de JNK y el receptor de estrógeno α mediada por AKT [149, 151].

Quinasas implicadas en la respuesta al estrés

Se han detectado quinasas en las mitocondrias que se sabe que desempeñan funciones clave en las respuestas al estrés celular, AKT, GSK-3b, PKA, ABL, PKC, AMPK, SRC, ATM y otros [94]. En concreto, la AKT es una quinasa promotora del crecimiento que actúa inhibiendo la apoptosis en presencia de glucosa y activando mTOR [152]. AKT también promueve la glucólisis mediante la fosforilación de hexokinase II (HKII) [153].

1.3.1. PPAR

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) son factores de transcripción nucleares dependientes de ligando. Son activados por hormonas, ácidos grasos endógenos y diversos compuestos nutricionales y, se ha visto que están implicados en la regulación de varias vías metabólicas como la homeostasis glucídica y de lípidos y el control de la proliferación y diferenciación celular.

Actualmente se conocen tres subtipos (PPAR α , PPAR γ y PPAR β/δ). PPAR α y PPAR δ se expresan principalmente en hígado, riñón y músculo esquelético y regulan genes implicados en la OXPHOS, la regulación de la homeostasis energética y la entrega de sustratos. Por el contrario, PPAR γ se expresa principalmente en el tejido adiposo y es

más importante en la lipogénesis y la síntesis de lípidos [154-157]. En especial se ha visto que la activación de PPAR γ aumenta la biogénesis mitocondrial, el consumo de oxígeno, el MMP mitocondrial, las defensas antioxidantes, regula la autofagia y aumenta los factores de transcripción, como PGC1 α , Nrf1–2 y TFAM [158]. Los PPAR constan de cuatro dominios funcionales (A/B, C, D y E/F) (Figura 9). El dominio N-terminal A/B contiene una función de activación independiente de ligando, responsable de la fosforilación de PPAR. El dominio C conserva la secuencia de unión al DNA, responsable de la unión de PPAR al elemento de respuesta al proliferador de peroxisomas (PPRE) en el promotor de los genes diana de PPAR. El dominio D es un sitio de acoplamiento para varios cofactores y el E tiene la capacidad de unirse a ligandos lipófilos endógenos o exógenos y al hacerlo le proporciona especificidad de ligando y la interacción con complejos coactivadores. Finalmente, el dominio E/F permite el reclutamiento de cofactores PPAR que participan en el proceso de transcripción [154,159-161]. Para que se activen los factores de transcripción PPAR es necesaria la unión de ligandos lipídicos afines, la heterodimerización con el receptor de retinoide X (RXR), la interacción con varios coactivadores transcripcionales como el PGC-1 α y, la unión del complejo PPRE (Figura 10) [154]; Secuencia consenso que consiste en la repetición de la secuencia hexamérica AGGTCA separada por un nucleótido espaciador menos conservado [162].



Figura 9. Representación esquemática de los principales dominios de los PPAR. Imagen extraída de (Han, L. 2017) [163].

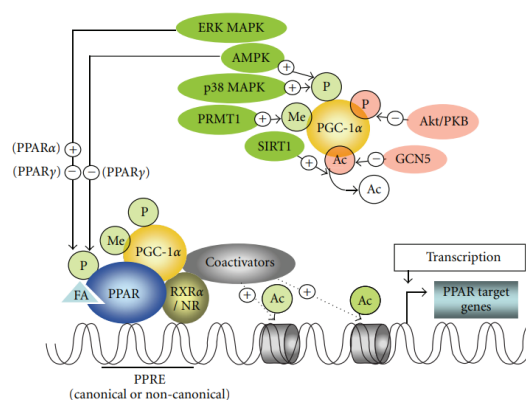


Figura 10. Eventos de señalización en el complejo activador PPAR-RXR-PGC-1 α . Imagen extraída de (Moreno, M. 2010) [164].

Además, los PPAR están involucrados en un mecanismo denominado "transrepresión", que es un mecanismo de represión genética dependiente de ligando a través de interacciones con otras proteínas como NF κ B, AP1 y STAT. Los heterodímeros PPAR/RXR pueden estar unidos a un complejo represor que contiene actividad histona desacetilasa,

como NcoR y SMART inhibiendo así la transcripción génica. Y, cuando se les une el ligando a PPAR o RXR se provoca el desplazamiento de los represores unidos y el reclutamiento de coactivadores como SRC-1 y PBP, lo que permite la modulación transcripcional de la transcripción génica (Figura 11) [156, 163, 165-167].

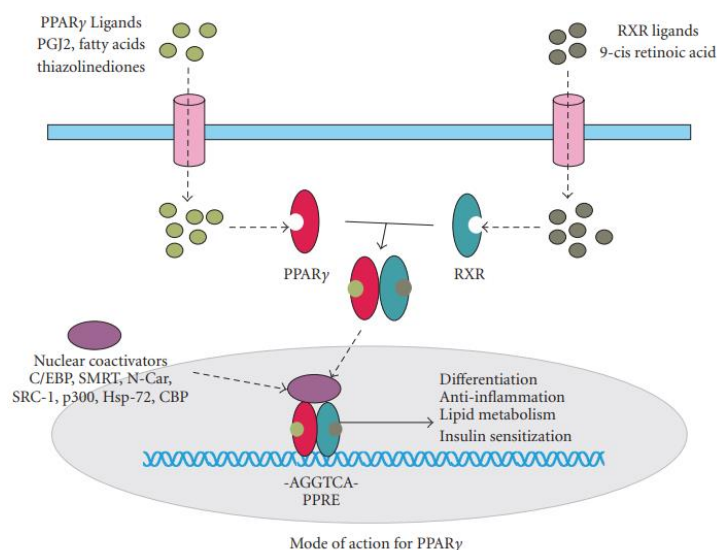


Figura 11. Modo de acción de PPARγ. PPAR, después de la unión con su ligando, se heterodimeriza con su compañero RXR y, como tal, se unen a los PPRE en la región promotora de los respectivos genes diana. Imagen extraída de (Wagner, E. 2010) [157].

Se ha observado que la desestabilización del dímero PPARγ-RXR por polimorfismos o mutaciones en el gen PPARγ puede conducir a una unión debilitada al DNA y alterar la función reguladora de PPARγ [168, 169]. En tejidos adiposos la fosforilación de PPARγ en la serina 273 por la proteína quinasa CDK5 también conduce a alteraciones del dímero PPARγ-RXR [170]. A diferencia de la fosforilación en otro residuo (Ser112), la cual se ha visto que tiene efectos positivos sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos [168].

Por otro lado, como se comenta anteriormente la activación de PPARγ está implicada en la regulación de PGC1α, Nrf1-2 y TFAM [158]. La vía PGC-1α-NRF-1/2-TFAM se ha visto que regula la biogénesis mitocondrial mediante una comunicación constante entre el núcleo y las mitocondrias [95]. El PGC-1α activado se traslada al núcleo, donde interactúa con los factores de transcripción Nrf1 y Nrf2, lo que lleva a la expresión de proteínas mitocondriales de la cadena respiratoria y el factor de transcripción TFAM, necesario para la transcripción y replicación del DNAm y biogénesis de nuevas mitocondrias [171-174]. Además, el PGC-1α también interactúa y coactiva numerosos factores de

transcripción nucleares encargados de regular vías involucradas en el metabolismo energético celular dentro y fuera de las mitocondrias. Entre ellos se destaca MEF-2, FOXO1, HNF-4, SREBP1 y ERR, entre muchos otros [175,176].

1.4. Las enfermedades mitocondriales primarias

Se ha observado que graves alteraciones de la maquinaria mitocondrial implicadas en la generación de energía conducen a un grupo de patologías progresivas y generalmente fatales conocidas colectivamente como enfermedades mitocondriales primarias (EM) que afectan a órganos que requieren una gran cantidad de energía, tales como los músculos o el cerebro [8, 177]. La EM afecta a 1 de cada 5000 niños a nivel mundial y actualmente no existe cura y los tratamientos disponibles son en su mayoría ineficaces [178].

El genoma mitocondrial se hereda por línea materna, lo que significa que la descendencia sería idéntica en DNAm_t [179, 180], sin embargo, las mitocondrias presentan una condición heterogénea del DNA definida como heteroplasia en la que puede haber DNAm_t normal (tipo salvaje) junto con DNAm_t mutado con diferentes tasas entre órganos, incluso en la misma mitocondria (Figura 12) [181].

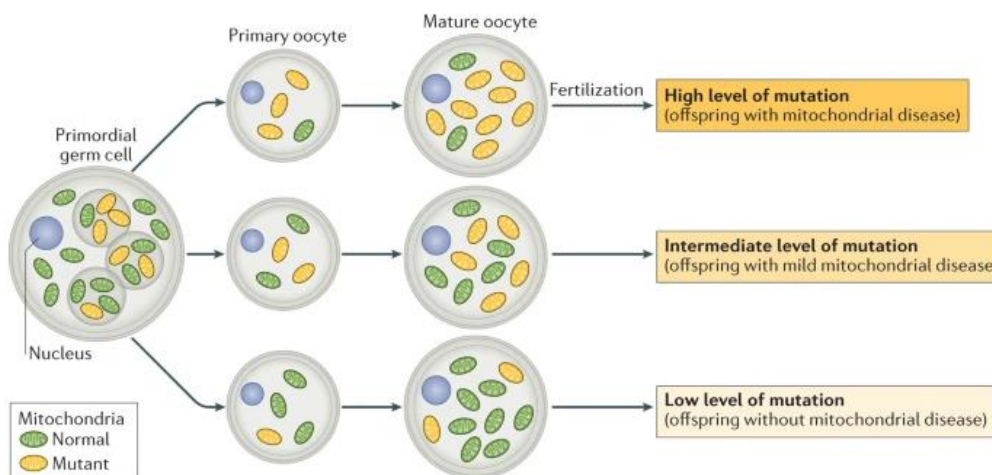


Figura 12. Transmisión de mutaciones del DNAm heteroplasmático de la madre a la descendencia. Imagen extraída de (Gorman, G. S., et al. (2016)) [182].

La fisiopatología de las enfermedades mitocondriales es compleja e implica mutaciones genéticas en el DNAm_t y el DNA nuclear (DNAn). Comprenden distintos tipos de transmisión (ligada al cromosoma X, autosómica, mitocondrial/materna) debido al

genoma nuclear, mitocondrial o en la interacción entre dos genomas, lo que resulta en una gran heterogeneidad y una amplia gama de presentación (Figura 13) [182, 183].

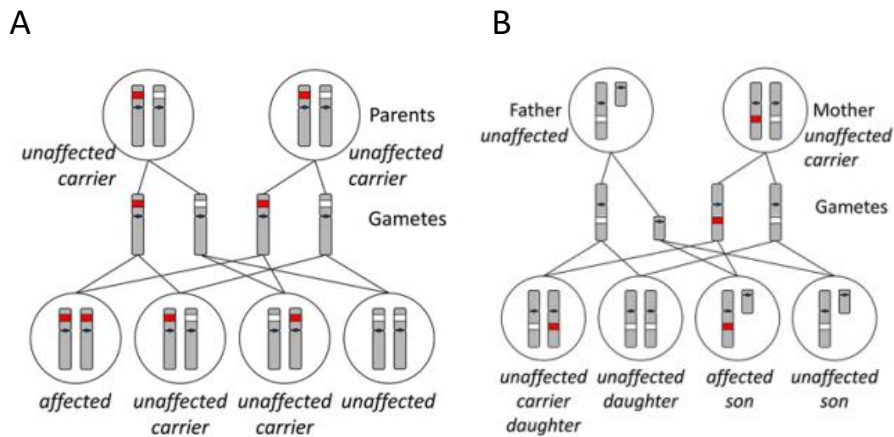


Figura 13. (A) Patrón de herencia de una variante autosómica recesiva (rojo). (B) Patrón de herencia de una variante recesiva ligada al cromosoma X (rojo). Imagen extraída de (Jackson, M., Marks, L., May, G. H. W., & Wilson, J. B. (2018)) [184].

Por lo tanto, las EM pueden deberse a cualquier interferencia en el metabolismo del ATP que afecte de alguna manera al proceso OXPHOS, mostrando una expresión clínica que puede variar entre descendientes, ya que se pueden producir diferentes porcentajes de energía en los distintos órganos de un mismo organismo (Figura 14) [179].

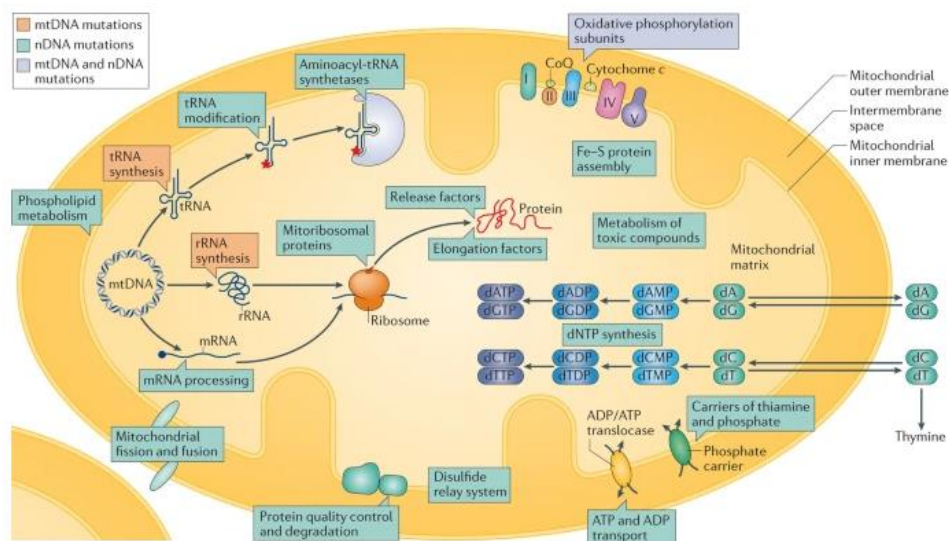


Figura 14. Genes asociados con enfermedades mitocondriales humanas y su papel en la función mitocondrial. Imagen extraída de (Gorman, G. S., et al. (2016)) [182].

La función mitocondrial alterada, además de provocar un déficit energético en la célula, es capaz de activar cascadas de señalización retrogradas que permiten enviar señales al

núcleo para reprogramar la expresión de genes nucleares [17, 96, 98]. Por lo que, las EM muestran fenotipos muy diferentes, ya que no afectan a todos los órganos por igual [185, 186]. Las mitocondrias son ubicuas y, por lo tanto, las EM pueden afectar a cualquier órgano, aunque los órganos con alta demanda de energía, como el cerebro, el músculo esquelético y el corazón, se ven particularmente afectados. Las características clínicas son heterogéneas y pueden ocurrir a cualquier edad manifestándose con una amplia gama de síntomas clínicos. Además, la mayoría de los pacientes presentan afectaciones multisistémicas [185, 186]. Algunas de las características clínicas asociadas con las enfermedades mitocondriales se pueden agrupar en síndromes específicos, por ejemplo, el síndrome de Leigh (también conocido como encefalomielopatía necrotizante subaguda) (Figura 15) [187].

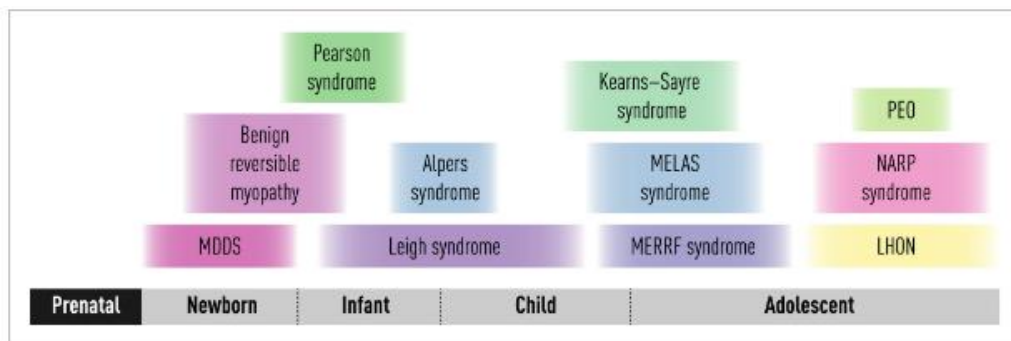


Figura 15. Enfermedades mitocondriales pediátricas ordenadas por edad de aparición. Imagen extraída de (Rahman S. (2020)) [188].

1.4.1. El síndrome de Leigh

El síndrome de Leigh (LS) es una enfermedad mitocondrial grave y progresiva causada por mutaciones en la maquinaria generadora de energía mitocondrial que suele manifestarse a una edad temprana. Su nombre hace referencia al neuropsiquiatra británico Archibald Denis Leigh al describir por primera vez la enfermedad en 1951 [189]. El síndrome de Leigh afecta a 1 de cada 40.000 nacimientos y suele empezar a los 2 años de edad [190]. La progresión suele ser episódica y suele provocar la muerte a los 3 años de edad. Sin embargo, los síntomas pueden surgir a cualquier edad, incluida la adolescencia o la edad adulta, normalmente después de un evento desencadenante que afecta la producción de energía del cuerpo como una infección o una cirugía [191, 192]. Y, mientras que algunos pacientes pasan largos períodos sin progresión de la enfermedad, otros desarrollan un deterioro progresivo [193]. Las manifestaciones

neurológicas típicas observadas incluyen hipotonía, ataxia, acidosis láctica, retraso y regresión del desarrollo, epilepsia y estrés respiratorio [194, 195]. No obstante, el LS en forma tardía se presenta de manera más heterogénea, con hallazgos conductuales/psiquiátricos, deterioro intelectual, trastornos del movimiento, dolores de cabeza, pérdida de memoria o incluso imitando un fenotipo de esclerosis múltiple [196]. En esta enfermedad, aunque es muy específica del SNC, la presentación también puede ser multisistémica con síntomas no neurológicos como disfunciones cardíacas, hepáticas, gastrointestinales y tubulares renales que clasifican esta afección como síndrome similar a Leigh (LLS) [191]. Se han identificado mutaciones en más de 75 genes, codificados por 2 genomas (mitocondrial y nuclear), implicadas en patogénesis del síndrome de Leigh [187]. Estos genes están asociados con vías de generación de energía mitocondrial, codificando subunidades de OXPHOS y factores de ensamblaje asociados, enzimas involucradas en la biosíntesis de ubiquinona y el complejo piruvato deshidrogenasa [197]. Entre ellos, mutaciones en genes que provocan una deficiencia del complejo I en la vía OXPHOS es la presentación bioquímica más común del LS [190, 198]. Por lo tanto, cualquier daño en la maquinaria de generación de energía mitocondrial disminuirá considerablemente el suministro de energía en órganos con alta demanda de energía y podría producir signos y síntomas en tejidos que requieren mucha energía [8, 177].

Se estima que la materia gris consume aproximadamente 2,5 veces más ATP que la materia blanca [65, 199]. Estudios de tomografía por emisión de posición muestran que la tasa metabólica cerebral de la glucosa, un indicador de la tasa de producción de ATP, es relativamente alta en el tronco encefálico y los ganglios basales/tálamo durante los primeros 6 meses de vida en condiciones de metabolismo basal [200-202]. En el LS el SNC se ve particularmente afectado con una degeneración de la sustancia gris que puede extenderse a una degeneración secundaria de la sustancia blanca [203], manifestando acidosis láctica y lesiones simétricas en los ganglios basales y el tronco encefálico, con gliosis, vacuolización, desmielinización, proliferación capilar, relativa preservación neuronal y hiperlacticoacidemia en sangre y/o líquido cefalorraquídeo [197, 204, 205]. Además de los ganglios basales y el tronco encefálico, el tálamo, la médula espinal y el cerebelo también pueden verse afectados [195, 205, 206]. Las neuronas con mayor demanda energética en reservas disfuncionales de ATP desencadenan una cascada de

estrés que culmina en gliosis y vacuolización de neuronas [207]. Aunque la gliosis, el proceso en el que se generan mayor cantidad de células gliales o células gliales más grandes, puede activarse inicialmente como un proceso regenerativo y curativo en respuesta al estrés y la disfunción neuronal, en estados prolongados el estrés metabólico de las propias células gliales puede generar cicatrices en el cerebro y comenzar a contribuir al desarrollo de la lesión y la vacuolación del neuropilo (espacio entre los cuerpos de células neuronales y gliales que está compuesto por dendritas, axones y sinapsis) [205, 208]. Además, Los cambios de pH en la sangre y el líquido cefalorraquídeo provocados por la hiperlacticoacidemia y el aumento de ROS, también pueden contribuir a la lesión del neuropilo y a la formación de lesiones (Figura 16) [209].

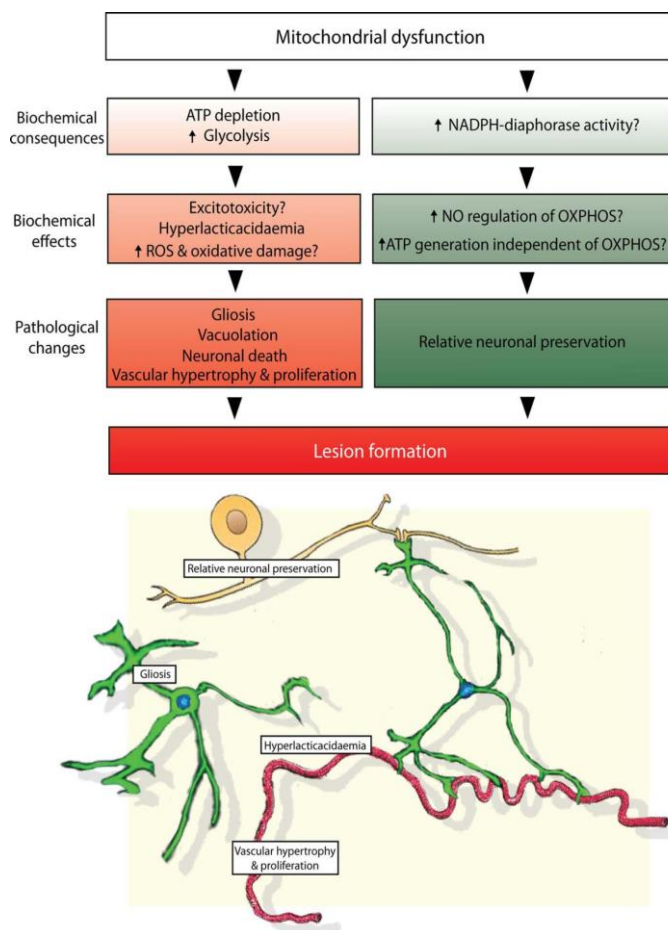


Figura 16. Resumen de las posibles consecuencias bioquímicas, efectos y cambios patológicos que conducen a la formación de lesiones en el LS. El agotamiento de ATP y el aumento de la glucólisis podrían conducir a un aumento de la producción de lactato e hiperlactacidemia y, la preservación relativa de las neuronas podría ser el resultado del aumento de la actividad de la NADPH diaporasa. Imagen extraída de (Lake, N. J., Bird, M. J., Isohanni, P., & Paetau, A. (2015)) [197].

El tronco del encéfalo participa en el mantenimiento de funciones vitales básicas como la respiración, la deglución y la circulación y los ganglios basales y el cerebelo controlan el movimiento y el equilibrio. Por lo tanto, el daño a estas áreas produce los síntomas principales del síndrome de Leigh (Figura 17). A medida que avanza la enfermedad, el

cerebro deja de controlar la contracción de los músculos y el sistema muscular se debilita. Se observa hipotonía (tono y fuerza muscular bajos), distonía (contracción muscular sostenida e involuntaria) y la ataxia (falta de control sobre el movimiento). Los músculos de los ojos se debilitan se paralizan o se vuelven incontrolables en condiciones llamadas oftalmoparesia o generan movimientos involuntarios en condiciones nistagmo [195].

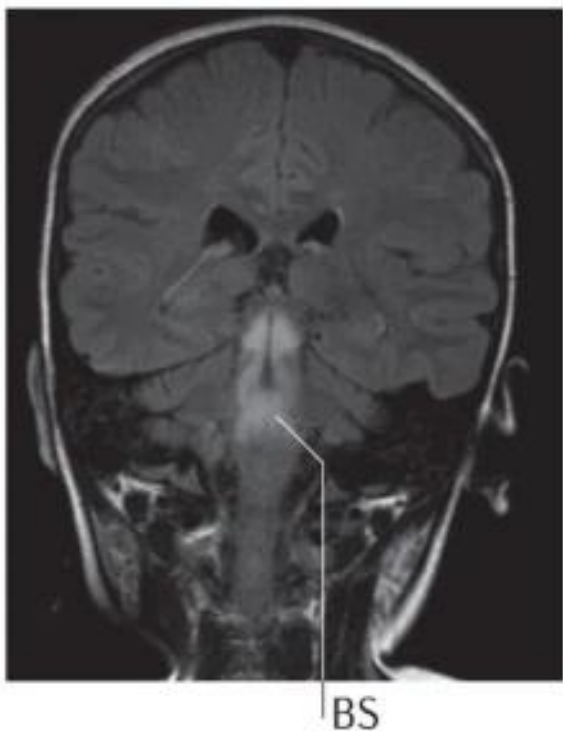


Figura 17. Resonancia magnética cerebral de paciente con síndrome de Leigh. Imagen ponderada en T2 con hiperintensidad en el tronco encefálico, lo que indica lesiones en esta región. Imagen extraída de (Gorman, G. S., et al. (2016)) [182].

El diagnóstico de LS requiere que la neuropatología o neurorradiología características, se acompañen de neurodegeneración progresiva con evidencia clínica de disfunción del tronco encefálico y/o de los ganglios basales, retraso del desarrollo intelectual y motor, y lactato sérico en líquido cefalorraquídeo elevado, lo que indica un metabolismo energético anormal [187, 195].

La heterogeneidad en la manifestación clínica de las enfermedades mitocondriales hace que tanto el diagnóstico como el tratamiento de estos trastornos sean extremadamente difíciles. Se han estudiado algunos tratamientos generales junto con terapias específicas para mejorar los síntomas, evitar la progresión de la enfermedad, la descompensación clínica y mejorar la calidad de vida [210]. En pacientes con LS que presentan niveles reducidos o ausentes de trifosfato de tiamina la suplementación diaria con tiamina trifosfato se ha visto que mejora la sintomatología [179, 211]. Recientemente, se ha

desarrollado el fármaco EPI-743, un análogo de la coenzima Q10, que ha demostrado tener un mejor perfil terapéutico. EPI-743 aumenta los niveles de glutatión intracelular al mejorar el stock reducido de glutatión intracelular [212]. Además, están surgiendo nuevas terapias, como la asistencia reproductiva y la terapia génica [213]. El uso de una endonucleasa de restricción en las mitocondrias logró eliminar el DNAm^t mutado preservando el tipo salvaje en células cultivadas [214].

La caracterización de una línea de ratón sin NDUF^S4 (NDUF^S4-KO), una subunidad del complejo mitocondrial I, representó un paso adelante significativo como modelo de EM, siendo uno de los pocos modelos que recapitulan fielmente la enfermedad humana [215, 216]. Estos ratones mutantes NDUF^S4-KO se desarrollan con normalidad, pero debido a la disfunción mitocondrial ocasionada por la alteración del complejo I mitocondrial, muestran signos de encefalomiopatía en el día posnatal 30 (P30) y finalmente mueren por alrededor del P50 por fallo respiratorio. Muestra fenotipos similares a los de los pacientes con LS, con una patología similar en los ganglios basales, el cerebelo y el bulbo olfatorio [215, 217]. Sin embargo, el efecto de la disfunción mitocondrial no es homogéneo entre las poblaciones neuronales y los determinantes moleculares de la vulnerabilidad neuronal en LS no se han aclarado adecuadamente, lo que limita el desarrollo de tratamientos eficientes [218-221].

Recientemente, se observó que la inactivación de NDUF^S4-KO en neuronas glutamatérgicas conducía a una disminución de la activación neuronal, un aumento en la inflamación del tronco del encéfalo y alteraciones motoras y respiratorias que conducían a una muerte prematura; Mientras que, la inactivación de NDUF^S4-KO en neuronas gabaérgicas provocaba inflamación en los ganglios basales sin afectación motora o respiratoria, pero acompañada de hipotermia y ataques epilépticos graves que preceden a la muerte [221].

2. El metabolismo del hierro en el sistema nervioso

El hierro es un metal indispensable en el cuerpo que actúa como cofactor necesario para procesos biológicos fundamentales, incluida la síntesis y reparación del DNA, el transporte de oxígeno, la respiración celular y la síntesis de neurotransmisores [222].

Existen dos estados de oxidación del hierro, hierro ferroso (Fe^{2+}) y hierro férrico (Fe^{3+}). El Fe^{2+} es relativamente soluble y altamente reactivo, participa en muchas funciones celulares como la síntesis de mielina, la síntesis de neurotransmisores y el metabolismo oxidativo; pero también puede catalizar la producción de ROS que pueden ser altamente tóxicas. De modo que, en condiciones fisiológicas, el Fe^{2+} se oxida a Fe^{3+} y forma hidróxidos férricos insolubles [223,224].

El metabolismo del hierro está estrictamente regulado mediante moléculas reguladoras clave. Alteraciones en la homeostasis del hierro a nivel cerebral, pueden provocar cambios patológicos graves en el SNC. Por ejemplo, la deficiencia de hierro puede ralentizar el desarrollo del sistema nervioso y causar trastornos del lenguaje y del movimiento [225], mientras que el exceso de hierro se ha visto relacionado con enfermedades neurodegenerativas [226].

En el organismo, el hierro Fe^{3+} es reducido a Fe^{2+} por la enzima ferrireductasa citocromo B duodenal (DcytB) y es absorbido por los enterocitos de las criptas de Lieberkühn del tracto gastrointestinal. Y, dado que el hierro no puede excretarse del organismo de forma regulada, la absorción de hierro representa el proceso críticamente controlado mediante el transportador de metal divalente 1 (DMT1) [227, 228]. El hierro absorbido puede almacenarse en la proteína ferritina (Ft). La proteína ferritina es un complejo proteico de almacenamiento de hierro que incluye la cadena ligera de ferritina (FTL) y la cadena pesada de ferritina (FTH1). La cadena pesada contiene un centro de ferroxidasa activo que cataliza la oxidación de Fe^{2+} a la forma Fe^{3+} redox-inerte, mientras que la cadena ligera promueve su nucleación dentro de la capa proteica para su almacenamiento [229]. O bien, el hierro absorbido también puede liberarse a la sangre mediante el transportador de ferroportina (Fpn). Para ello, es necesario que el hierro esté en su forma Fe^{3+} redox-inerte, por lo que mediante la enzima ferroxidasa hefestina (HEPH), acoplada a Fpn, se cataliza la oxidación de iones Fe^{2+} a Fe^{3+} [230, 231]. Luego, Fe^{3+} se une a la proteína transferrina (Tf), que tiene una alta afinidad por Fe^{3+} y permite el transporte a través del torrente sanguíneo por los órganos del cuerpo [229]. El receptor de transferrina (TFR1) es responsable de la captación de hierro mediada por transferrina en las neuronas y la glía mediante endocitosis mediada por receptores [232]. Pero primero el hierro necesita atravesar la BBB para poder entrar en

el cerebro. Mediante los TFR1 ubicados en los endotelios de los vasos sanguíneos cerebrales, la proteína Tf unida a los iones de hierro se une firmemente al receptor TFR1 y es arrastrada hacia el interior de la célula mediante endocitosis [233]. No obstante, el hierro libre también puede entrar en la BBB directamente mediante el transportador DMT1 (Figura 18) [234, 235].

La homeostasis del hierro en el cerebro está regulada principalmente por los transportadores de hierro TFR1, DMT1 y Fpn. El bajo pH del endosoma libera el hierro unido a Tf y reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} mediante el antígeno prostático epitelial de seis transmembranas 1-4 (STEAP 1-4). Luego, el DMT1 libera este Fe^{2+} al conjunto de hierro lábil (LIP) en el citosol, donde se almacena en estado redox-inerte en la proteína Ft [236, 237].

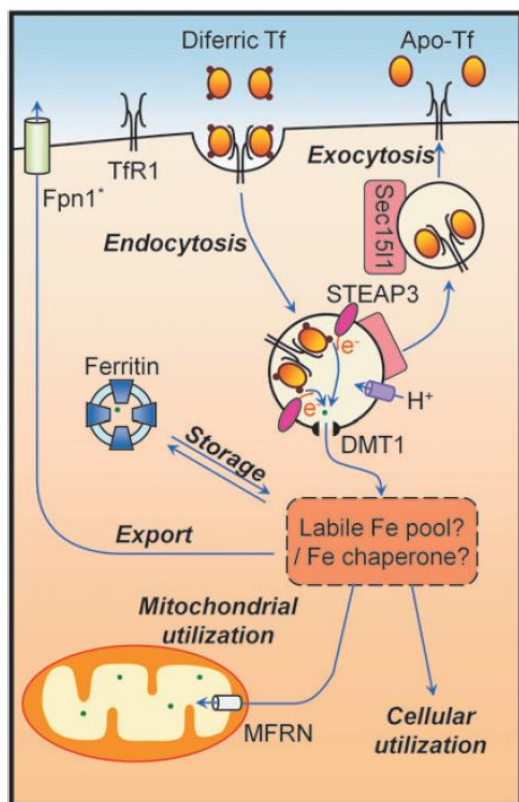


Figura 18. Esquema del metabolismo del hierro en la célula. La absorción de hierro en la célula se ve facilitada por la unión a la Tf y la endocitosis mediada por el receptor TFR1. Posteriormente el hierro es exportado al citosol mediante DMT1. En el citosol permanece en una reserva de hierro lábil o unido a proteínas chaperonas de hierro como Ft hasta ser transportado a orgánulos como la mitocondria o bien, ser exportado de la célula por la Fpn. Imagen extraída de (Huang, M. L., Lane, D. J., & Richardson, D. R. (2011)) [18].

Para prevenir las células del daño oxidativo el hierro está estrictamente regulado mediante unas proteínas. La hepcidina es una proteína clave en el metabolismo del hierro que regula las concentraciones séricas de Fpn, provocando su fosforilación, internalización y posterior degradación lisosomal [238]. Traduccionalmente también se regula la homeostasis del hierro mediante la interacción entre las proteínas reguladoras de hierro (IRP 1 y IRP2, también conocidas como ACO1 y IREB2) y las estructuras

horquilla cis conservadas conocidas como IRE. Las IRP 1 y 2 son proteínas de unión a RNAm que actúan como sensores de hierro de las células y se unen a IRE para controlar los niveles de hierro intracelular. Los IRE están ubicados en las regiones no traducidas (UTR) 3' o 5' de RNAm de proteínas involucradas en el metabolismo del hierro. La unión de IRPs1/2 a IRE en la 5'-UTR de RNAm seleccionados inhibe la traducción del RNAm, mientras que la unión de IRPs1/2 a IRE en la 3'-UTR protege al RNAm de la degradación mediada por nucleasas, lo que lleva a un aumento de traducción [236]. Por otro lado, cuando el hierro abunda en la célula, la unión IRP-IRE disminuye. IRP1 se une a ISC y se convierte en una aconitasa citosólica incapaz de unirse a IRE, mientras que IRP2 es el objetivo de la degradación [25].

2.1. El Hierro en condiciones patológicas: ferroptosis

El estrés oxidativo implica la producción excesiva de ROS, que tienen la capacidad de causar daños celulares a través de la oxidación y nitración de lípidos, proteínas, DNA y RNA, así como de importantes componentes celulares. Es bien aceptado que el exceso de ROS media la disfunción neuronal y la muerte [239]. El hierro ferroso mediante la reacción de Fenton es capaz de catalizar la formación de ROS, concretamente el radical hidroxilo (OH) (Figura 19). Estos radicales hidroxilo pueden causar peroxidación lipídica en la membrana celular, lo que tiene consecuencias devastadoras, como la ferroptosis (Figura 20) [240]. La ferroptosis es una forma oxidativa de muerte celular regulada recientemente descubierta que presenta agotamiento de glutatión y formación perjudicial de ROS lipídicas, debido a una alteración de la defensa redox por parte de la glutatión peroxidasa-4 (GPX4) (Figura 21) [241]. En condiciones fisiológicas, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) citosólicos libres se conjugan con la coenzima A y se incorporan a los fosfolípidos de la membrana plasmática, pero cuando aumentan los niveles de hierro lábil por alteraciones en el metabolismo del hierro celular, se cataliza la formación de hidroperóxidos de fosfolípidos (PLOOH) que se acumulan en la membrana plasmática [242]. El exceso de hierro dona electrones para generar ROS según la reacción de Fenton, que contribuye a la peroxidación lipídica y la disfunción mitocondrial. Esta peroxidación lipídica puede acumularse en la membrana plasmática y perder la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática o acumularse en la membrana mitocondrial y alterar la función mitocondrial [243]. Primero, mediante

interacciones con radicales de hidroxilo se forma una molécula radical a partir de un PUFA de membrana. Esto deja un electrón libre en el ácido graso, lo que provoca la reordenación de los electrones a una posición más favorable y da como resultado un radical lipídico [244]. Este radical puede reaccionar fácilmente con el oxígeno molecular para formar un radical lipídico peroxilo, capaz de extraer hidrógeno de una molécula de PUFA vecina. El hidrogeno extraído se agrega al radical lipídico peroxilo generando tanto un hidroperóxido lipídico como un nuevo radical lipídico [245].

La GPX4 es una selenoproteína que desempeña un papel clave en la defensa enzimática contra la peroxidación lipídica de la membrana al reducir los PLOOH en lípidos complejos, como los alcoholes fosfolípidos (PLOH) [243]. El sistema antiportador transmembrana L-cistina/glutamato (Glu) Xc-, que consiste en una cadena ligera (xCT, también denominada SLC7A11) y una cadena pesada (4F2, también denominada SLC3A2) de proteínas transmembrana unidas por un enlace disulfuro covalente, transporta el Glu intracelular al espacio extracelular y L-cistina extracelular al interior de la célula en una proporción de 1:1 [246]. La cisteína sirve como precursor crítico del glutatión, un importante antioxidante en las células; siendo que el glutatión en su forma reducida sirve como cofactor para la desintoxicación de ROS, como GPX4 [246]. El agotamiento de antioxidantes en células ferroptóticas se ha atribuido a la alteración de GPX4 [241]. Por ejemplo, la alteración de GPX4 y la peroxidación lipídica se han descrito como características clave de la ferroptosis en la isquemia cerebral [247], la enfermedad de Alzheimer [248, 249], la enfermedad de Parkinson [250-252] y la enfermedad de Huntington [253].

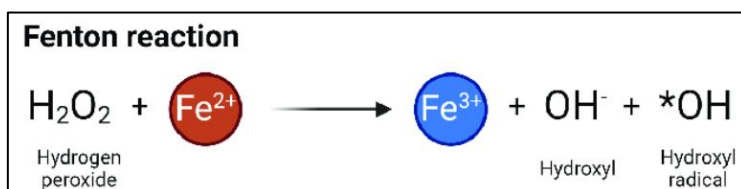


Figura 19. Reacción de Fenton. Imagen extraída de (Wright, J. A., Richards, T., & Srai, S. K. (2014)) [254].

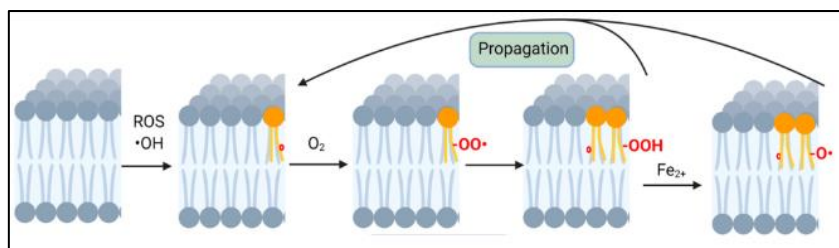


Figura 20. Formación de peróxidos lipídicos en la membrana celular. (los electrones del radical se indican con un círculo rojo). Imagen extraída de (Mortensen, M. S., Ruiz, J., & Watts, J. L. (2023)) [255].

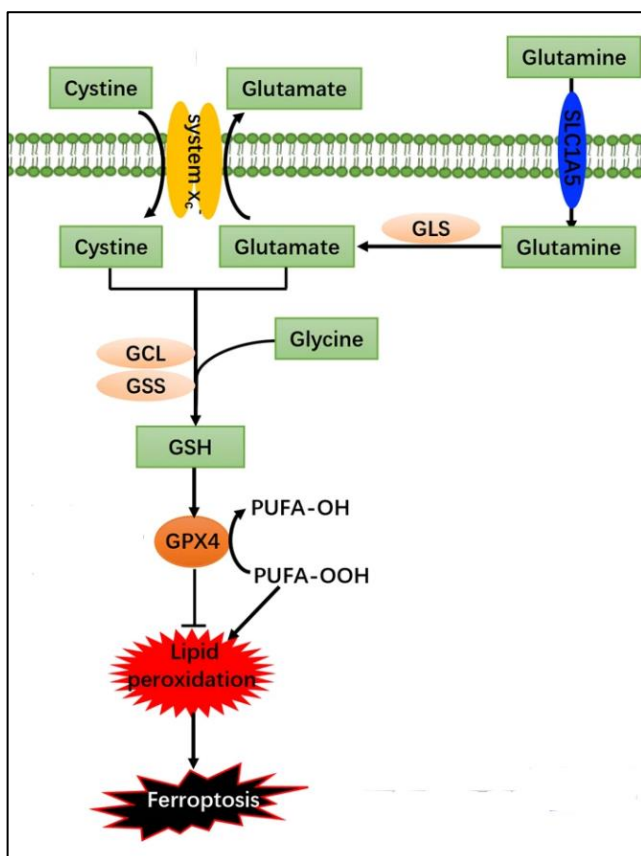


Figura 21. Vía reguladora de la ferroptosis. La supresión del sistema Xc- o de la actividad GPX4, desencadena una excesiva peroxidación lipídica que conduce a la ferroptosis celular. Ya que, la disponibilidad de cisteína y GSH está regulada por el sistema antiportador de cistina-glutamato Xc- y, GSH es un cofactor clave de GPX4 para eliminar los peróxidos lipídicos. Imagen extraída de (Yu, Y., Yan, Y., Niu, F., Wang, Y., Chen, X., Su, G., Liu, Y., Zhao, X., Qian, L., Liu, P., & Xiong, Y. (2021)) [256].

3. El metabolismo de la glucosa en el sistema nervioso

El cerebro humano es el órgano con mayor requerimiento energético de todos los órganos, consumiendo aproximadamente entre el 20 y el 25 % de la cantidad total de glucosa utilizada por el cuerpo [257, 258]. La glucosa es el combustible orgánico predominante del cerebro y, por tanto, el sustrato más importante para el correcto funcionamiento del cerebro. Durante el desarrollo del cerebro aumenta el consumo de glucosa en relación a la necesidad de crear nuevas estructuras y conexiones cerebrales. Por tanto, las alteraciones en la homeostasis de la glucosa irán inevitablemente

asociadas a cambios en el desarrollo del sistema nervioso [259, 260]. Además de la glucosa existen otras posibles fuentes de energía para el sistema nervioso en mamíferos como el lactato [261, 262], los cuerpos cetónicos [263] y el glutamato [264]. No obstante, aunque estos metabolitos son una importante fuente energética para el cerebro, no son suficiente para reemplazar completamente la glucosa. Cuando los niveles sistémicos de glucosa en sangre caen, los niveles bajos de carbohidratos endógenos no pueden satisfacer las necesidades energéticas del cuerpo, lo que provoca cetogénesis [265, 266].

3.1. Transporte y metabolismo de la glucosa en el sistema nervioso

La microvasculatura del SNC está envuelta en una barrera semipermeable compuesta por células endoteliales conectadas estrechamente entre sí y unidas a células adyacentes (pericitos, astrocitos, células de la microglía y neuronas), lo que permite regular el transporte de sustancias entre la sangre y el SNC [267]. Por lo que para que el cerebro pueda metabolizar la glucosa, esta tiene que atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) desde el torrente sanguíneo [268]. Las proteínas transportadoras de glucosa (GLUT) catalizan el transporte de glucosa a través de la membrana celular por difusión facilitada. En humanos, se han descrito hasta 14 isoformas diferentes (GLUTs 1-14) codificadas por los genes SLC2 (solute carrier family 2) [269]. Siendo las isoformas GLUT1 y GLUT3, codificadas por los genes SLC2A1 y SLC2A3 respectivamente, los principales transportadores de glucosa en el SNC [270, 271].

El transporte de la glucosa a través de la BBB se da a por gradiente de concentración mediante la isoforma más glicosilada de GLUT1, expresada en las células endoteliales de los vasos sanguíneos [271], o bien, en menor relevancia, por transporte activo catalizado por una familia de cotransportadores dependientes de sodio (SGLT) codificados por los genes SLC5 [272]. Una vez en el líquido intersticial cerebral, la glucosa es captada mediante una isoforma menos glicosilada del transportador GLUT1, expresada principalmente en células de la glía (astrocitos y oligodendrocitos) [271] y la isoforma GLUT3, presente en la superficie de la membrana de las neuronas [270].

Se ha observado que GLUT3 tiene mayor afinidad por la glucosa y mayores niveles de expresión durante el desarrollo cerebral que GLUT1 [273]. Una vez dentro de las células, la glucosa intracelular es inmediatamente fosforilada por la enzima HKII para evitar que

abandone la célula, dando lugar a la glucosa-6-fosfato (Glc-6-P) que será metabolizada en 5 vías más (Figura 22) [274]:

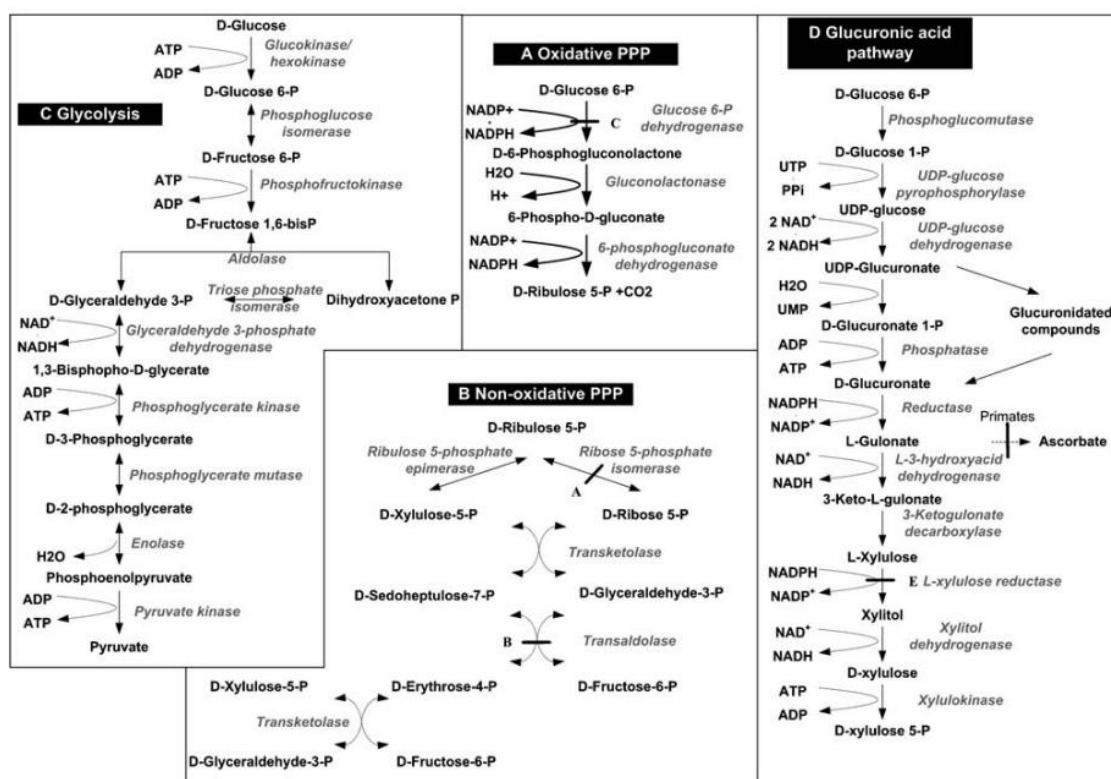


Figura 22. Esquema de las vías implicadas en el metabolismo de la glucosa. Imagen extraída de (Wamelink, Struys and Jakobs, (2008)) [275].

Glucólisis

La glucólisis es la vía metabólica principal del metabolismo de la glucosa. Consta de 10 reacciones enzimáticas, mediante las cuales la glucosa se oxida con el fin de producir energía y poder reductor, además de la síntesis de metabolitos esenciales. Por cada molécula de glucosa se genera un total de dos moléculas de ATP, dos moléculas de NADH y dos moléculas de piruvato. Y, el piruvato obtenido puede utilizarse para la síntesis de alanina, reducirse por la lactato deshidrogenasa a lactato o, transformarse en acetil-CoA para incorporarse al ciclo de Krebs [275]. En la primera etapa de la glucólisis, a partir de dos moléculas de ATP y una molécula de glucosa se generan los intermediarios fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) y Glc-6-P. Seguidamente, la Glc-6-P entra en la segunda etapa de la glucólisis para ser metabolizada por gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

(GAPDH) y oxidada a piruvato, generando así 2 moléculas de ATP y 1 molécula de NADH por cada molécula de Glc-6-P [275]. En la regulación del flujo glucolítico participan tres enzimas limitantes de la glucólisis que inducen o reprimen su actividad alostéricamente en función de los requerimientos energéticos de la célula. La HKII mediante el consumo de una molécula de ATP se encarga de fosforilar la glucosa en el primer paso de la glucólisis. La fosfofructoquinasa-1 (PFK1), al igual que la HKII, mediante el consumo de una molécula de ATP se encarga de fosforilar la fructosa-6-fosfato dando lugar a la fructosa-1,6-bifosfato. Y, la piruvato quinasa, a diferencia de las otras dos, se encarga de la defosforilación del fosfoenolpiruvato (PEP), dando lugar a piruvato y ATP [276]. Además, la 6- fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa (PFKFB3) induce en gran medida el flujo glucolítico al convertir la fructosa-6-fosfato para dar lugar a la fructosa-2,6- bifosfato, principal activador de la PFK1 [277].

Como subproducto de la glucólisis se forma inevitablemente metilglioxal, un compuesto altamente reactivo. No obstante, en situaciones normales las células están protegidas contra la toxicidad del metilglioxal mediante diferentes mecanismos y, en particular, el sistema glioxalasa, que representa la vía más importante para la desintoxicación del metilglioxal [278]. El metilglioxal reacciona con GSH para formar un hemitioacetal que glioxalasa-1 utiliza como sustrato para formar S-lactoilglutación. Luego, glioxalasa-2 cataliza la transformación de S-lactoilglutación en D-lactato, reciclando GSH en el proceso [279]. El metilglioxal se forma por descomposición espontánea de intermediarios de triosa fosfato en la glucólisis o mediante la degradación oxidativa tanto de carbohidratos como de lípido. Reacciona fácilmente con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos para formar productos finales de glicación avanzada (AGE), asociados a patologías como la diabetes, el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas [278].

Vía de las pentosas fosfato (PPP)

En la mayoría de los tejidos, el 80-90% de la oxidación de la glucosa se produce mediante la glucólisis. No obstante, el 10 o el 20% restante se produce mediante la PPP. La PPP, proporciona una vía alternativa para la oxidación de la glucosa y es la principal fuente de poder reductor en forma de NADPH en las células de mamíferos. La producción de

NADPH se utiliza como agente reductor en muchas vías biosintéticas y es importante para la protección contra el daño oxidativo mediante la regeneración del principal antioxidante a nivel celular, el GSH, a partir de su forma oxidada GSSG [275]. La vía se divide en una parte oxidativa y otra no oxidativa. En la vía oxidativa se genera NADPH y pentosas fosfato (ribulosa-5-fosfato), necesarias para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, a partir de tres reacciones irreversibles. Mientras que en la vía no oxidativa se reconvierten las pentosas fosfato en Glc-6-P mediante reacciones reversibles [275]. En la primera reacción de la vía oxidativa se encuentra la enzima limitante glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), la cual se sabe que está regulada por la ratio NADPH/NADP [280] y cataliza la reacción de la Glc-6-P en 6-fosfoglucono- δ -lactona mediante la reducción de dos moléculas de NADP⁺ [281]. Durante la vía no oxidativa se generan intermediarios metabólicos que varían en su estructura de entre tres a siete carbonos. Entre ellos destaca la fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, los cuales también son intermediarios glucolíticos y pueden por lo tanto reincorporarse en esta última vía [275, 282, 283]. Además de la eritrosa-4-fosfato, que se utiliza como metabolito precursor en la síntesis de la histidina y otras biomoléculas como la vitamina B6 [283].

Las neuronas, dado que son células especialmente sensibles al daño oxidativo [284], degradan continuamente la enzima PFKFB3 para reducir el flujo glucolítico y dirigir más glucosa hacia la PPP, protegiendo así las células del daño oxidativo [285].

Vía del ácido glucurónico

La vía del ácido glucurónico, es una vía alternativa para la oxidación de la glucosa similar a la PPP que no produce ATP. Esta vía produce NADH y UDP-glucuronato activado que se puede incorporar a proteoglicanos y glicoproteínas o se puede conjugar con bilirrubina, esteroides, xenobióticos, y muchos otros compuestos que contienen grupos hidroxilo (-OH). La vía del ácido glucurónico comienza con la conversión de Glc-6-P en Glc-1-P por la fosfoglucomutasa, que luego se activa a UDP-glucosa por la UDP-glucosa pirofosforilasa y es metabolizada hasta obtener la D-xilulosa-5P, la cual puede ser metabolizada a través de PPP [275].

Biosíntesis de la hexosaminas

La glucosa también se puede ser metabolizada por la vía de las hexosaminas, en la cual entre un 2 y un 5% de la fructosa-6-fosfato se convierte en glucosamina-6-fosfato por la enzima limitante L-glutamina D-fructosa-6-fosfatoamidotransferasa (GFAT) [286].

La biosíntesis de hexosaminas se divide en dos fases: la síntesis de la UDP-GlcNAc y la transferencia o la eliminación de la O-GlcNAc. La importancia de esta vía reside en el hecho de que el producto principal, la UDP-GlcNAc, es el substrato de toda una larga lista de enzimas implicadas en O-GlucosilNAcetilación de proteínas. La O-GlucosilNAcetilación de proteínas es una modificación postraducciona que juega un papel clave en la remodelación de histonas, transcripción de proteínas, proliferación celular, apoptosis y degradación de proteínas [286, 287].

Síntesis de glucógeno

La glucosa se puede almacenar en la célula mediante la síntesis de glucógeno. La glucógeno sintasa (GS) es la enzima que se encarga de sintetizar este polisacárido de reserva energética mediante la transferencia del grupo glucosil de la UDP-glucosa al polímero glucógeno en formación. En el sistema nervioso el glicógeno se almacena casi exclusivamente en los astrocitos [288], para mantener los requerimientos energéticos de las neuronas degradando el glicógeno almacenado y liberándolo en forma de lactato [289]. Las neuronas también expresan la maquinaria necesaria para la síntesis del glicógeno, no obstante, su actividad se encuentra reprimida [290].

3.2. Otras vías metabólicas implicadas en la producción de energía

A partir de la generación de piruvato, producto final de la glucólisis, se desempeñan una serie de procesos bioquímicos implicados en el metabolismo energético celular, claves para la proliferación y el crecimiento celular. El piruvato es un compuesto orgánico clave para la generación de energía en la célula que puede seguir varios caminos. Puede incorporarse al ciclo de Krebs, ser metabolizado por la lactato deshidrogenasa o participar en la síntesis de aminoácidos [282].

Ciclo de Krebs

Para incorporarse al ciclo de Krebs el piruvato es descarboxilado a acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) en la matriz mitocondrial. Este complejo enzimático está formado por la enzima PDH, siendo esta la subunidad E1 del complejo, la dihidrolipoil transacetilasa o subunidad E2, la dihidrolipoil deshidrogenasa o subunidad 3 y, la proteína de unión a E3 [291]. La actividad de PDH puede verse alterada mediante fosforilaciones, cuando es fosforilada su actividad queda reprimida [292]. La molécula de acetil-CoA se incorpora al ciclo de Krebs para ser oxidada hasta generar dos moléculas de CO₂, una de GTP, una de FADH₂ y tres de NADH. Seguidamente las moléculas de coenzimas, FADH₂ y NADH, producidas por la succinato deshidrogenasa, pueden ser reoxidadas en la cadena de transporte de electrones dando lugar a un total de 11 moléculas de ATP por cada molécula de acetil-CoA oxidada (Figura 23) [293].

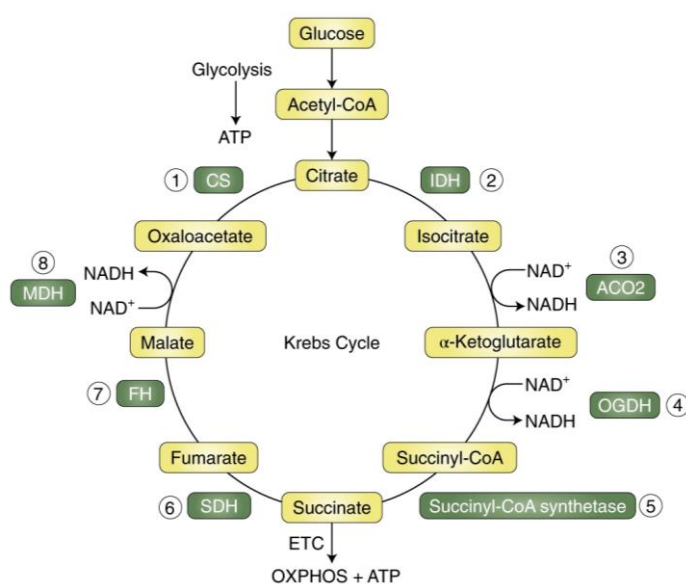


Figura 23. Esquema del ciclo de Krebs. Imagen extraída de (Ryan, D. G., Murphy, M. P., Frezza, C., Prag, H. A., Chouchani, E. T., O'Neill, L. A., & Mills, E. L. (2019)) [293].

La molécula de acetil-CoA puede obtenerse a partir del metabolismo oxidativo de la glucosa, como se ha explicado anteriormente, pero también a partir del metabolismo oxidativo de lípidos y proteínas. Los carbonos de ácidos grasos y aminoácidos dan lugar a acetil-CoA mediante la beta oxidación de ácidos grasos y la vía catabólica de aminoácidos (p. ej. desaminación oxidativa), respectivamente [294].

Metabolismo de la glutamina

Cuando el flujo glucolítico es superior a la actividad del complejo PDH, los niveles de piruvato citoplasmático también pueden utilizarse para la síntesis de aminoácidos. Mediante la enzima alanina transaminasa (ALT) se cataliza la transferencia de un grupo amino del glutamato al piruvato dando lugar a alanina y α -cetoglutarato [293].

La glutamina apoya el metabolismo oxidativo mitocondrial cuando el piruvato derivado de la glucosa se convierte en lactato y se secreta [295]. La glutamina es un aminoácido no esencial (NEAA) que tiene un papel versátil en el metabolismo celular, participando en la suplementación del ciclo de krebs y en la biosíntesis de nucleótidos, GSH y otros aminoácidos no esenciales. En la matriz mitocondrial la glutamina se convierte en glutamato mediante la enzima glutaminasa (GLS). Y, a continuación, la glutamato deshidrogenasa o varias aminotransferasas catalizan la desamidación del glutamato produciendo α KG α -cetoglutarato, la cual suministra metabolitos para el ciclo de Krebs [296].

3.3. Transporte y metabolismo del lactato en el sistema nervioso

El lactato, producto glucolítico del metabolismo de la glucosa, también es transportado a través de la BBB y la membrana celular mediante los transportadores de monocarboxilato (MCTs) [297, 298]. Los MCTs también son importantes en el metabolismo energético celular. Actualmente se han descrito 14 isoformas diferentes de MCT codificadas por los genes SLC16 (solute carrier family 16), pero solo 4 median el transporte de monocarboxilatos unidos a protones (MCTs 1-4) [299].

Otra familia de transportadores implicada en el transporte de monocarboxilatos endógenos son los MCT acoplados a sodio (SMCT), los cuales actúan como transportadores simultáneos y dependen de un gradiente de sodio para su actividad funcional [300].

Se ha descrito que los MCTs 1-4 median el transporte de monocarboxilatos de cadena corta como el lactato, pero también son capaces de transportar piruvato y cuerpos cetónicos [301]. En condiciones hipóxicas, cuando la glucosa se convierte en la vía predominante, para satisfacer las demandas energéticas se activa la vía glucolítica dando como resultado la formación de lactato [301]. La glucosa intracelular se oxida mediante

la ruta glucolítica hasta obtener piruvato, el cual puede reducirse a lactato mediante la enzima lactato deshidrogenasa [302]. Y, este lactato debe exportarse fuera de la célula para que continúe la glucólisis [303]. Mediante el MCT1, expresado principalmente en células endoteliales de microvasos, endimocitos y astrocitos, se transporta del lactato a través de la BBB [177]. Y, en el transporte de monocarboxilatos endógenos hacia y desde las células cerebrales participan MCT1, MCT2 y MCT4 (Figura 24) [298]. Siendo MCT1 y MCT4 predominantes en células astrogliales y MCT2 la isoforma principal en las neuronas [304].

Durante la activación sináptica neuronal, se ha visto que los astrocitos son una fuente importante de energía, metabolizan la glucosa en lactato y lo exportan al exterior para ser absorbido por las neuronas. Esto se conoce comúnmente como la hipótesis de la lanzadera de lactato astrocito-neurona [298, 305].

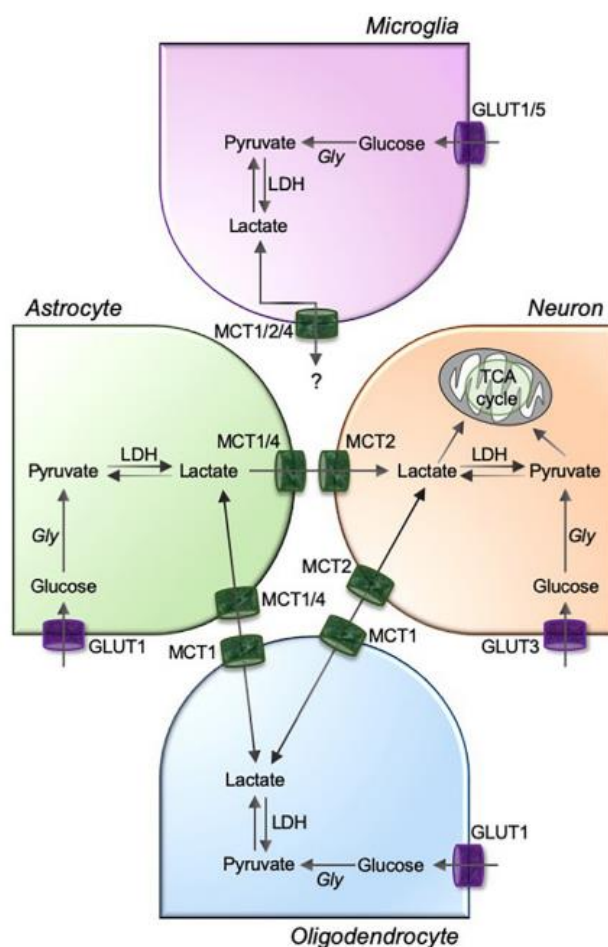


Figura 24. Esquema de los diferentes MCTs y GLUTs expresados en el cerebro. Imagen extraída de (Jha, M. K., & Morrison, B. M. (2020)) [306].

Metabolismo del lactato

Cuando la demanda de oxígeno y ATP excede el suministro celular aumenta la producción de lactato, generando poder reductor como combustible para la célula [307]. El piruvato, además de ser oxidado en las mitocondrias, también puede seguir una ruta distinta a la anterior en el citoplasma de la célula. Para ello, mediante la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) el piruvato es reducido a lactato, generando moléculas de NAD⁺ (Figura 25). La reacción catalizada por esta enzima, por tanto, permite regenerar la coenzima NAD⁺ reducida durante la glucólisis sin recurrir a la cadena de transporte de electrones. Seguidamente, el lactato sintetizado es transportado entre células glucolíticas y oxidantes mediante el transportador MCT para mantener la homeostasis del lactato dentro de diferentes tejidos [307].

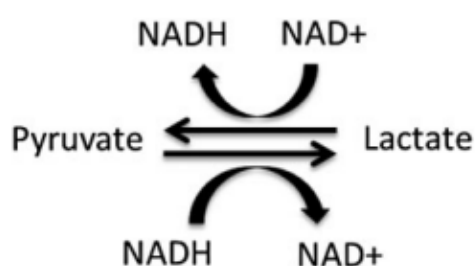


Figura 25. Esquema de la reacción catalizada por la LDH. Imagen extraída de (Valvona, C. J., Fillmore, H. L., Nunn, P. B., & Pilkington, G. J. (2016)) [302].

Existen cuatro genes LDH: LDHA, LDHB, LDHC y LDHD. Siendo LDHA, LDHB y LDHC isómeros L capaces de utilizar o producir L-lactato, el principal enantiómero presente en vertebrados. A diferencia del LDHD, el cual es un isómero D [302]. LDHA, o también conocido como subunidad M, tiene una carga neta de -6 y una mayor afinidad por el piruvato, convirtiendo preferentemente el piruvato en lactato y NADH en NAD⁺. Mientras que el LDHB, conocido como subunidad H, tiene una carga neta de +1 y una mayor afinidad por el lactato, convirtiendo preferentemente lactato en piruvato y NAD⁺ a NADH [308, 309]. Estos genes LDH pueden formar homotetrámeros o heterotetrámeros. Hay cinco isoenzimas de LDH que se pueden producir a partir de las subunidades M y H: LDH-1 (4H), LDH-2 (3H, 1M), LDH-3 (2H, 2M), LDH-4 (1H, 3M) y LDH-5 (5M) (Figura26) [309].

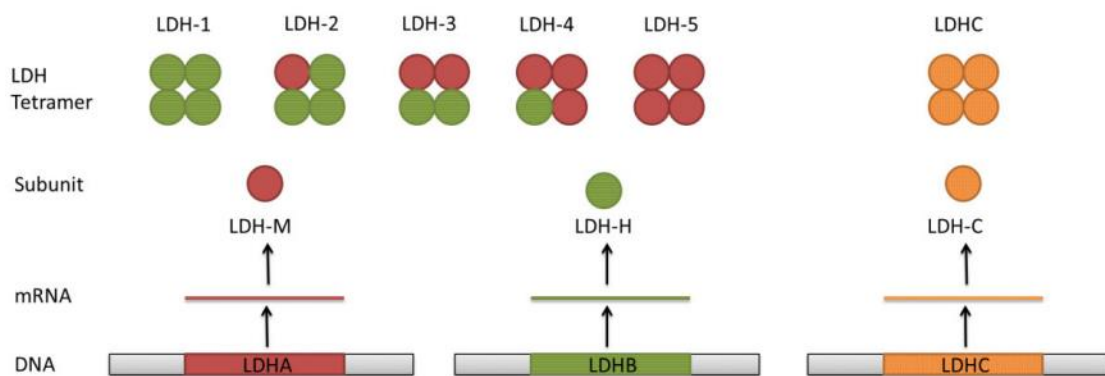


Figura 26. Formación de homo homotetrámeros o heterotetrámeros de la LDH. Imagen extraída de (Valvona, C. J., Fillmore, H. L., Nunn, P. B., & Pilkington, G. J. (2016)) [302].

Una vez sintetizado el lactato puede seguir varias vías. Puede ingresar en las mitocondrias, ser oxidado a piruvato y ser metabolizado a través del ciclo de Krebs, o bien, convertirse en glucosa mediante gluconeogénesis [307].

Recientemente en 2019 se observó que el lactato podía modificar los residuos de lisina (K) de histonas en un proceso denominado lactilación, una modificación postraducciona que conduce a la regulación transcripcional [310]. Zhang et al. propusieron, en primer lugar, que la lisina de las histonas podía marcarse con L-lactato (L-la) mediante un mecanismo enzimático en el que el L-la se transformaba a su forma activada L-lactil-CoA. Luego, con ayuda de los "escritores" p300 y CBP la L-lactil-CoA transfería los grupos lactilo a residuos de lisina en las histonas desempeñando un papel importante en la regulación transcripcional [310]. Esta modificación epigenética en las histonas es una nueva característica de la modificación postraducciona. Sin embargo, también se han identificado lactilaciones de lisina en proteínas no histonas [311-316]. Gaffney et al. observaron modificaciones epigenéticas en las que la lisina era marcada con D-lactato (D-la) en proteínas no histonas [317].

El proceso de lactilación consta de enzimas específicas o complejos enzimáticos conocidos como "escritores" y "borradores" que controlan la adición y/o eliminación de grupos lactilo en residuos de lisina, activando señales transcripcionales que luego son leídas por proteínas efectoras conocidas como "lectores" para influir en las vías de señales posteriores e iniciar diversos eventos biológicos [318]. Actualmente, se ha demostrado que la lactilación está regulada tanto por HAT como por HDAC, actuando

como “escritor” y “borrador” respectivamente, aunque el vínculo entre la lactilación y la acetilación aún no se ha definido (Figura 27) [310, 319].

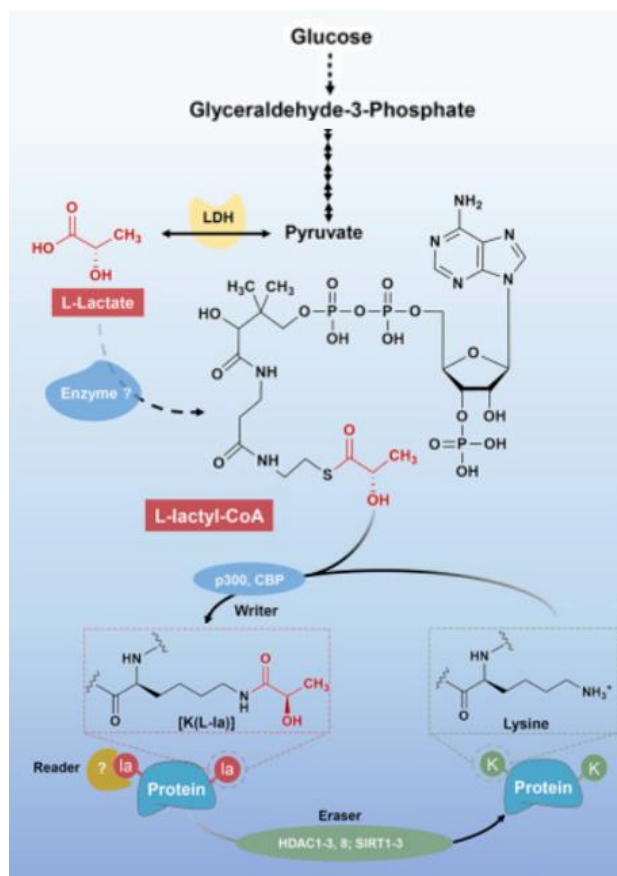


Figura 27. Esquema del mecanismo de lactilación de proteínas. El l-lactato se transforma en su forma activada, L-lactil-CoA y actúa como sustrato directo transfiriendo grupos lactilo a residuos de lisina en las histonas con ayuda de los "escritores", p300 y CBP. Imagen extraída de (Liu, X., Zhang, Y., Li, W., & Zhou, X. (2022)) [320].

Por lo tanto, el lactato puede convertirse en lactil-CoA y participar en la lactilación de histonas y proteínas no histonas además de, actuar como regulador de la retroalimentación metabólica y como molécula de señalización. Desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo energético, las respuestas inmunitarias, la formación de la memoria, la cicatrización de heridas y el desarrollo de tumores [307]. Además, se ha visto que en ausencia de glucosa el lactato apoya la transmisión sináptica neuronal [321]. No obstante, el aumento del lactato si no es eliminado por la célula puede acumularse y provocar acidosis láctica. El ácido láctico disminuye el pH extracelular y puede comenzar a acidificar los tejidos, disminuyendo su actividad metabólica [307]. Además, las modificaciones de la lactilación se han visto implicadas en los mecanismos de múltiples enfermedades [322], así como en la regulación de la

función cerebral y los mecanismos implicados en el desarrollo de enfermedades cerebrales [313, 323].

4. El cannabidiol

La maquinaria molecular del sistema endocannabinoide opera mediante un mecanismo de señalización retrógrada. En los terminales postsinápticos los endocannabinoides (ECB) se sintetizan a demanda después de la activación neuronal de manera dependiente de Ca^{2+} y, activan los receptores cannabinoides presinápticos (CB1, CB2) acoplados a proteína G (Gi/o) (Figura 28). Este mecanismo es responsable de la depresión a largo plazo de las neuronas glutamatérgicas estimulantes y del control de la plasticidad neuronal a corto y a largo plazo [324].

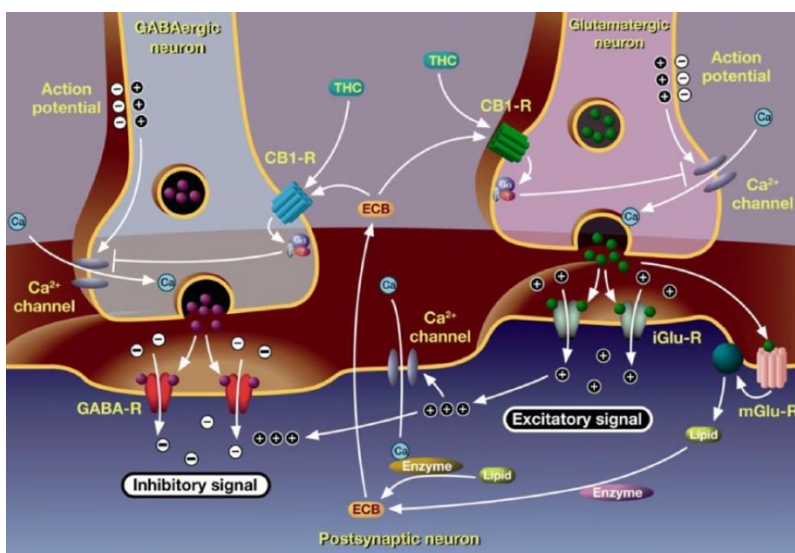


Figura 28. Sistema endocannabinoide. La síntesis de ECB, inducida mediante la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato postsinápticos (mGlu-R) y niveles elevados de calcio citoplasmático, activa los receptores CB1 presinápticos, inhibiendo así la entrada de calcio presináptico y la liberación de neurotransmisores. Imagen extraída de (Zettl, U. K., Rommer, P., Hipp, P., & Patejdl, R. (2016)) [325].

Las vías de señalización de los endocannabinoides se han implicado en una amplia gama de procesos neurobiológicos, incluido el control del movimiento, la cognición, el aprendizaje y la memoria, el alivio del dolor y la promoción de la supervivencia neuronal después de una isquemia o un traumatismo cerebral [326-330]. El sistema endocannabinoide está compuesto por los receptores CB1 y CB2, sus ligandos

endógenos araquidonoiletanolamida (AEA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y, las enzimas responsable de la síntesis, recaptación y degradación de endocannabinoides amida hidrolasa de ácido graso (FAAH) y lipasa monoacilglicerol (MAGL) [331]. Los receptores CB1 se encuentran principalmente en células del SNC, mientras que los receptores CB2 están presentes en terminales nerviosos periféricos, células inmunes y, el tronco del encéfalo [331].

Un componente de la planta cannabis sativa, el cannabidiol (CBD), ha demostrado tener propiedades farmacológicas [332], entre ellas se destacan sus propiedades antidepresivas [333], antiinflamatorias [334], neuroprotectoras [335], anticonvulsivas [336], de actividad inmunomoduladora [337] y antioxidante [338]. El CBD es un cannabinoide exógeno no psicotomimético con múltiples objetivos moleculares dentro de la célula. Actúa como antagonista de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 [339], sin embargo, tiene la capacidad de inhibir la degradación de endocannabinoides a través de la enzima FAAH [340], lo que aumenta los niveles de endocannabinoides provocando la activación de los receptores; también muestra actividad de agonista total de los receptores de serotonina 5-HT1A [341], los canales TRPV1 [340] y los receptores de adenosina A1 [342], además de un agonismo parcial en los receptores de dopamina D2 [343]. El CBD también puede generar cambios en la transcripción genética mediante la activación de los receptores PPAR γ intracelulares, responsables del efecto positivo del CBD sobre el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos [344, 345], participa en la modulación alostérica negativa de μ receptor opioide MOR [346] y tiene un efecto inhibitor general sobre los canales de sodio y calcio, ejerciendo un efecto modulador sobre el potencial eléctrico de la membrana (Figura 29) [347]. El CBD también promueve un conjunto complejo de cambios en vías intracelulares cruciales, como mTOR, autofagia, GSK3b y AKT, lo que resulta en neuroprotección, disminución de las respuestas proinflamatorias y facilitación de eventos neuroplásticos [348, 349]. Los cannabinoides reducen la inflamación periférica al actuar en los receptores TRPV1, CB2 y GPR55, lo que conducen a una regulación negativa de las enzimas implicadas en la producción de prostaglandinas, especies reactivas de oxígeno y citocinas [350]. El CBD tiene propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias al inhibir la producción de citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-17A. Además, la reducción de la peroxidación

lipídica mediada por PPAR γ , también están implicadas en los efectos antiinflamatorios de los cannabinoides en el SNC [350].

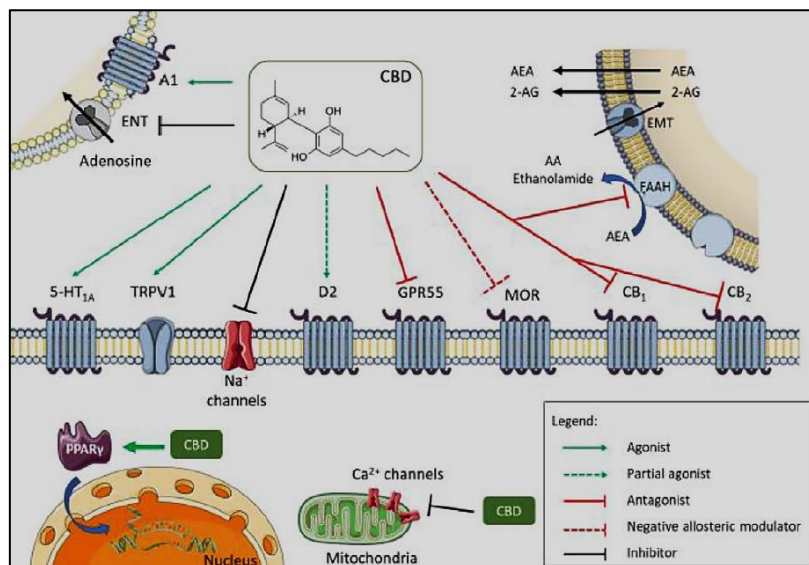


Figura 29. Múltiples objetivos moleculares para el CBD. Imagen extraída de (de Almeida, D. L., & Devi, L. A. (2020)) [351].

A microscopic image of neural tissue, likely a brain section, showing a dense network of neurons and their processes. The tissue is stained with a green fluorescent dye, highlighting the cell bodies and the intricate web of axons and dendrites. The background is a dark, textured pattern of these stained structures.

OBJETIVOS

El metabolismo y la señalización celular son procesos profundamente interrelacionados en los que las rutas metabólicas son reguladas por vías de señalización y al mismo tiempo los cambios metabólicos influyen en la actividad de diversas vías metabólicas. El objetivo de esta tesis es determinar cómo las neuronas adaptan su metabolismo frente a estímulos fisiológicos y patológicos y estudiar las consecuencias que esto tiene sobre la fisiología neuronal. En concreto, nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la regulación del metabolismo del hierro por la actividad sináptica y su papel en la bioenergética mitocondrial.
2. Determinar el papel del metabolismo del hierro en la patofisiología del síndrome de Leigh.
3. Investigar el mecanismo molecular por el que el cannabidiol mejora la patología del síndrome de Leigh.



MATERIALES Y **MÉTODOS**

1. Modelos animales

En este Trabajo se han utilizado ratas y ratones estabulados en la Unidad de Experimentación Animal (UEA) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. La experimentación animal con ratas y ratones es clave para la investigación biomédica; Debido a que gran parte de sus procesos bioquímicos son similares a los de la especie humana. La posibilidad de generar mutaciones genéticas en ellos permite estudiar enfermedades que afectan a los humanos y encontrar tratamientos efectivos o, al menos, entender mejor cómo funciona la enfermedad para avanzar en el laborioso trabajo de la investigación biomédica. Además, estos animales son los más comúnmente usados en laboratorios gracias a su fácil manejo y adaptabilidad y a su rápida reproducción.

1.1. Ratas

Se utilizaron ratas de la cepa *Sprague Dawley*. El personal técnico del animalario (UEA) se encargó de cruzar estas ratas para que cada semana obtuviéramos una rata gestante de entre 19-21 días de gestación. Después de sacrificar la rata se le extrajeron los embriones y se realizaron los cultivos primarios de neuronas corticales (ver sección 2.3.).

1.2. Ratones

Se utilizaron ratones transgénicos (B6.129S4-Ndufs4^{tm1.1Rpa}/J) a los cuales, mediante técnicas de orientación genética, se les había eliminado el segundo exón del gen NDUFS4 [217]. Para obtener el mutante homocigoto *knockout* (KO) se cruzaron ratones heterocigotos para el alelo nulo NDUFS4 (NDUFS4^{+/-}) con un fondo genético mixto (Figura 30).

Este modelo animal recapitula fielmente la enfermedad mitocondrial humana del síndrome de Leigh. La falta de la subunidad mitocondrial NDUFS4 provoca una deficiencia en el complejo I mitocondrial, mostrando fenotipos similares a los de los pacientes con LS, que incluyen lesiones cerebrales, neuroinflamación, dificultad para prosperar, déficits motores, anomalías respiratorias y muerte prematura, entre otros [217].

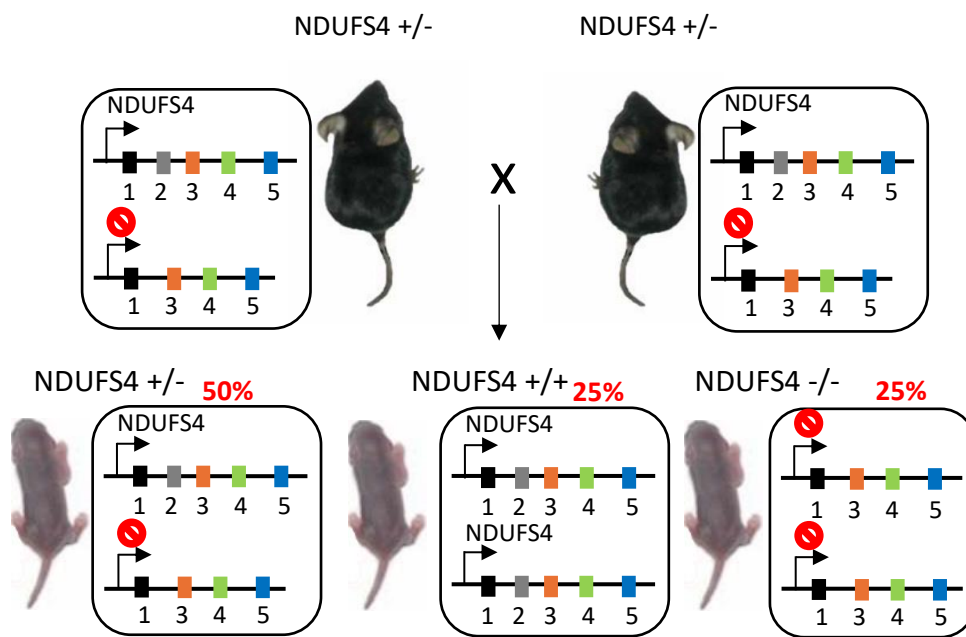


Figura 30. Esquema de la estrategia de apareamiento seguida para generar ratones NDUFS4 -/- (NDUFS4-KO) y su correspondiente condición de control NDUFS4 +/+ (WT).

1.2.1. Mantenimiento de la colonia

Los animales se mantuvieron en condiciones estandarizadas con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, temperatura estable ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad controlada ($55 \pm 10\%$) y alimento y agua ad libitum. Se cruzaron de manera continua machos y hembras NDUFS4 +/- para obtener ratones que carecían constitutivamente de NDUFS4 (NDUFS4-KO) y los ratones control (incluidos los compañeros de camada tanto de tipo salvaje como heterocigotos, denominados colectivamente control). Los ratones NDUFS4-KO nacían de cruces HET en casi la proporción mendeliana esperada (WT:HET:KO; 1,4:1,9:1,0) y generalmente podían ser reconocidos ya en el día 16 posnatal (P16) por su pelaje escaso o tamaño pequeño (Figura 31). Para el mantenimiento de la colonia se genotiparon los animales y se dejaron únicamente crecer aquellos ratones con el genotipo HET para poner futuros cruces una vez entraran en estado reproductivo. Por otro lado, para realizar los cultivos primarios de neuronas, astrocitos o microglía se

genotiparon los ratones posnatales entre el día 4 y 7 y se utilizaron los genotipos homocigotos (WT;KO).

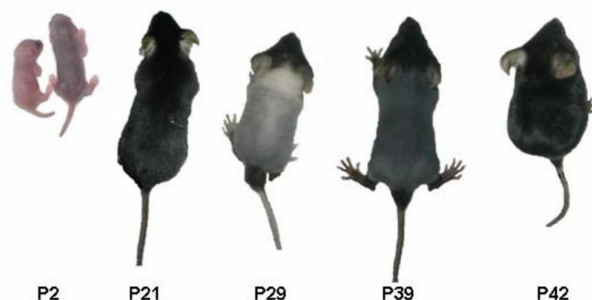


Figura 31. Fotografías de ratones NDUFS4-KO a diferentes días. A partir del día 29 se observa una pérdida de cabello que se recupera a día p42. Además, a día P42 los ratones presentan una apariencia encorvada. Imagen extraída de (Kruse, S. E., Watt, W. C., Marcinek, D. J., Kapur, R. P., Schenkman, K. A., & Palmiter, R. D. (2008)) [217].

1.2.2. Genotipado

Con el fin de determinar el genotipo de los ratones de la colonia NDUFS4-KO, se extrajo DNA de alguno de sus tejidos. En ratones posnatales se extrajo de la punta de las colas, mientras que en ratones adultos se extrajo de trozos de oreja utilizando un perforador de orejas. Para ello, se siguieron los siguientes pasos.

Extracción de DNA de tejido

1. Se añaden 0,5 ml de NaOH 50 mM en el eppendorf que contiene el tejido y se incuba durante 5 minutos a 100°C.
2. Para disgregar el tejido se pipetea y se vuelve a incubar a 100°C durante 5 minutos más.
3. Se añaden 60 µl de Tris-HCl 1 M (pH 6,8) y se incuba a 100°C otros 5 minutos.
4. Se centrifuga durante 5 minutos a 13.000 rpm para precipitar los restos de tejido. En el sobrenadante se encuentra el DNA disuelto.

Reacción en cadena de la polimerasa ("PCR")

A partir del DNA extraído se realizó el genotipado utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (ver sección 4.4.), mediante secuencias de cebadores (primers) complementarias a las hebras de DNA que se quieren amplificar, diseñadas específicamente para la región de interés. En este trabajo se utilizó la solución *GoTaq*®

G2 Green Master Mix de Promega que contiene la DNA polimerasa Taq polimerasa termoestable, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), MgCl₂ y tampones de reacción en concentraciones óptimas para una amplificación eficiente.

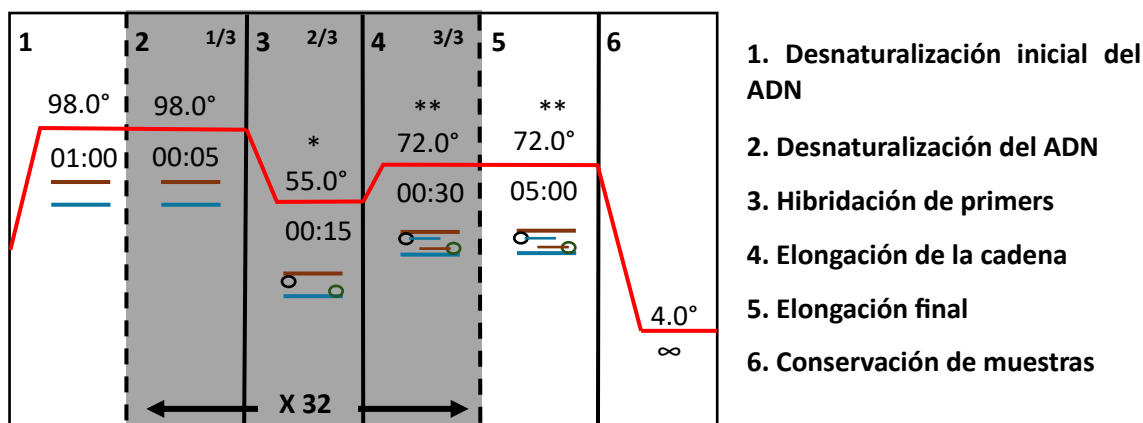
1. Se prepara en hielo la mezcla de reacción en un volumen final de 26 µl por muestra.

Tabla 1. Mezcla de reacción GoTaq.

Componente	Cantidad
DNA	1µl
NdufsWT Forward Primer 10 µM	1µl
NdufsWT Reverse Primer 10 µM	1µl
NdufsKO Reverse Primer 10 µM	1µl
GoTaq Green MM, 2X	12,5µl
Agua libre de DNAsas	9,5µl

2. Se introducen las muestras en el termociclador programado para que realice las distintas fases de la reacción, ajustando la temperatura, tiempo y número de ciclos adecuados.

Tabla 2. Condiciones del termociclador.



* La temperatura puede variar en función de la temperatura de fusión de los *primers*.

** La temperatura puede variar en función del tamaño del producto que se quiera amplificar (1 Kb/min).

Electroforesis en gel de agarosa

Una vez amplificados los fragmentos de DNA por PCR, se visualiza el producto utilizando la técnica de electroforesis en gel de agarosa (ver sección 4.5.). En concreto, para

visualizar el producto de PCR del genotipado se utilizó una concentración del 1,8% (p/v). Para el genotipo WT se espera observar una banda a 150 bp, para el genotipo NDUFS4-KO una banda a 300 bp y, para el genotipo heterocigoto dos bandas, una a 150 bp y otra a 300 bp.

2. Cultivos primarios

Trabajar con células cultivadas *in vitro* permite estudiar los procesos moleculares que se dan a nivel celular y manipular y cuantificar los ensayos realizados con mayor facilidad. Por lo que supone una gran ventaja a la hora de investigar rutas metabólicas, ya que se trabaja bajo condiciones controladas. En este trabajo se han realizado cultivos primarios murinos de astrocitos y microglía cortical y de neuronas aisladas de diferentes regiones cerebrales (cerebelo, tronco del encéfalo y córtex). En investigación se suelen utilizar líneas celulares inmortalizadas como modelo de tejido. Estas células proliferan indefinidamente debido a una mutación que evade la senescencia celular normal y les permite seguir experimentando división celular, de esta manera pueden cultivarse *in vitro* durante largos períodos de tiempo. En el caso de las neuronas, estas no presentan capacidad de crecimiento o división, por lo que cada vez que se trabaja con estas células se deben generar cultivos primarios a partir de la disgregación de tejido cerebral. Del mismo modo, los astrocitos poseen una capacidad de crecimiento limitada y la microglía al proliferar en cultivo pierde sus características de expresión génica y función.

2.1. Preparación del coating

Para cultivar las células *in vitro* se utilizan placas de cultivo hechas de vidrio de borosilicato o plástico transparente (normalmente poliestireno o policarbonato), que permiten una observación microscópica sin distorsiones. Gracias a la superficie de poliestireno los grupos hidrófilos permiten la adhesión de las células mediante la unión de las proteínas de la superficie celular al plástico.

Las neuronas tienen bastante carga negativa dentro de ellas, en contraste con la carga positiva exterior. Por lo que para que las neuronas se adhieran a estas placas es necesario generar una capa con poli-D-lisina, un homopolímero de lisina sintético que permite la interacción entre las cargas positivas del polímero y las cargas negativas de las neuronas,

y laminina, una glicoproteína con mayor presencia en la lámina basal. La presencia de poli-D-lisina y laminina a diferentes concentraciones permite la adhesión de las neuronas manteniendo la estabilidad de las dendritas en el pocillo. EL *coating* se realiza en la campana de flujo laminar de la siguiente manera:

1. En el caso de cultivos primarios de neuronas se tratan las placas con poli-D-lisina y laminina. Se utiliza a una concentración de 1 mg de poli-D-lisina y 0.375 mg de laminina para 75 ml de agua bidestilada (soluciones previamente atemperadas a 37°C). En el caso de cultivos primarios de astrocitos y microglía se tratan las placas o frascos poli-D-lisina. En una concentración de 1 mg de poli-D-lisina para 75 ml de agua bidestilada (soluciones previamente atemperadas a 37°C).
2. Se vierten 0,5 ml de *coating* a cada pocillo (volumen para placas de 24 pocillos) o 5 ml por cada T75 cm² Cell Culture Flask y se incuban durante un mínimo de dos horas en la incubadora a 37°C y 5% CO₂ (si para el experimento a realizar posteriormente es necesario, antes de verter el *coating*, se coloca un cubreobjetos redondo en el interior de cada pocillo).
3. Pasado el tiempo de incubación se aspira el coating y se hace un lavado con agua bidestilada. Se dejan secar las placas en el interior de la campana de flujo laminar.

2.2. Preparación de medios y soluciones utilizadas

Para realizar los cultivos primarios se han utilizado los medios y soluciones descritos en la sección 17.1. Aquellas soluciones o medios que no eran estériles de fábrica se han filtrado mediante un filtro de vacío con poros de 0. 22 µm de diámetro o se han autoclavado. Los medios y soluciones se conservan hasta aproximadamente un mes como máximo, cuando se observan cambios en el pH.

Preparación de las soluciones de disección

Antes de proceder a la extracción y disgregación de las cortezas cerebrales murinas se preparan las soluciones necesarias para su disección en condiciones de esterilidad.

Medio de disociación (DM): Para 500 ml, se añade en agua milli-Q 40,9 ml Na₂SO₄ 1 M, 60 ml K₂SO₄ 0.25 M, 1,46 ml MgCl₂ 2 M, 0,126 ml CaCl₂ 1 M, 0,5 ml HEPES 1 M, 4 ml glucosa 2,5 M y 1 ml rojo de fenol 0,5%.

Solución de ácido quinurénico (KyMg “K”): Para 80 ml de volumen final en agua bidestilada, se añaden 158,56 mg ácido quinurénico, 5 ml agua bidestilada y 0,4 ml rojo de fenol 0,5%. Después de agitar extensamente, se añade NaOH 1 M (<0.5ml) hasta que la solución se vuelva rosácea. Se añade 0,4 HEPES 1 M, 4 ml MgCl₂ 2 M y se agita de nuevo.

Solución de papaína (E): Para 50 ml, se mezclan 5 ml ácido quinurénico, 45 ml medio de disociación y 22,5 mg L-cisteína. Se corrige el pH añadiendo NaOH 0,2 M (<0.8ml) hasta que la solución se vuelva rosácea. Se añaden 500 U de papaína, y se incuba en el baño a 37°C y agitando repetidas veces para su correcta disolución.

Solución de disección (DM+K): Para 40 ml, se mezcla 36 ml de medio de disociación y 4 ml de solución de ácido quinurénico, previamente descongelado en un baño a 37°C. Se corrige el pH añadiendo NaOH 100 mM (100-200 µl).

2.3. Cultivos primarios de neuronas corticales de embriones de rata

Para los cultivos primarios de neuronas corticales de rata se ha seguido un protocolo previamente establecido en el laboratorio de Giles Hardingham (Soriano et al. 2008). Para ello, se han utilizado embriones de ratas *Sprague Dawley* gestantes entre los días 19-21 de gestación, los cuales poseen la plasticidad neuronal necesaria para realizar los cultivos primarios. Todo el procedimiento de aislamiento y disgregación de tejido se lleva a cabo en condiciones de esterilidad, en las campanas de flujo laminar de clase II.

Las ratas gestantes se sacrifican por asfixia mediante CO₂ en las instalaciones del animalario y se confirma la muerte del animal mediante la ausencia de reflejo de parpadeo o de respuesta al dolor mediante un estímulo de presión. Se trasladan rápidamente al laboratorio y con la ayuda de material quirúrgico desinfectado con etanol al 70% se realiza la extracción de los embriones:

1. Se realiza una incisión en la parte abdominal del animal y se extraen los embriones retirándolos del saco amniótico y cortando el cordón umbilical. Se decapitan e inmediatamente se introducen en un tubo con 10 ml de solución de disección previamente atemperada a 37°C.

2. A partir de aquí se trabaja en la campana de flujo laminar. Se extrae el cerebro utilizando el material de disección y se deposita en una placa de 35 mm con solución de disección y P/E al 1%.
3. Con la ayuda de la lupa binocular se separan los hemisferios y se extrae el corpus callosum, el hipocampo y las meninges (cada córtex se disgrega en un volumen final de 13 ml y se siembran 0.5 ml/placa de 24 pocillos y 2.5ml/placa de 6 pocillos. Por lo que en función del número de placas a sembrar se extraerán más o menos cortezas).
4. Se traspasan las cortezas a una placa de 35 mm con solución de disección sin P/E y, de aquí a un tubo de plástico con la base redondeada.
5. Para disgregar enzimáticamente el tejido se hacen dos incubaciones de 20 minutos a 37°C con 2 ml de la solución enzimática (E) previamente descongelada.
6. Tras los 20 minutos de la segunda incubación se elimina toda la solución enzimática posible mediante dos lavados con 2 ml de DM y dos lavados con 2 ml de medio NBA (1%).
7. Se retira el último lavado y se añaden 2 ml más de NBA (1%). Se disgrega mecánicamente el tejido con la ayuda de una pipeta de 2 ml pipeteando arriba y abajo de forma rápida unas 50-60 veces.
8. Se añaden 2 ml más de medio y se deja reposar el tubo para que sedimenten al fondo del tubo los fragmentos de tejido no disgregado. Tras 5 minutos se pasa a un tubo cónico de 15 ml y se repite el paso anterior dos veces más. Finalmente, se añaden 2 ml extra.
9. Los 10 ml de NBA (1%) con las neuronas disgregadas se disuelven en el optiMEM necesario, previamente atemperado a 37°C, y se siembran las células en las placas previamente preparadas con el *coating* (se siembran 0,5 ml/placa de 24 pocillos, 3ml/placa de 6 pocillos o en placas de 35 mm, 0,25ml/placa de 48 pocillos y 0,15-0.3ml/placa de 96 pocillos).
10. Se incuban durante 2,5 horas en el incubador a 37°C y 5% de CO₂. Pasado ese tiempo, se substituye el medio de siembra por NBA (1%) previamente atemperado a 37°C (0,15-0,5-1-2 ml para placas de 96-48-24-6 pocillos, respectivamente) y se dejan crecer los cultivos en la incubadora de cultivos a 37°C y un 5% de CO₂.

11. A día in vitro 4 (DIV4) se añade medio fresco NBA (1%) con el inhibidor de la mitosis “AraC” a una concentración final de 1,2 mM. Se añade la misma cantidad que se había sustituido por el medio de siembra; 0,15-0,5-1-2 ml para placas de 96-48-24-6 pocillos, respectivamente.
12. A días in vitro 7-9 (DIV7-9), período en el cual las neuronas se desarrollan, expresan los diferentes receptores sinápticos y establecen las diferentes conexiones sinápticas, se hacen los respectivos experimentos. Dependiendo del tipo de experimento se cambiará el medio en el que estaban por medio TM_O o TM_{ITS} para estimulación sináptica o transfección, o bien, por la solución SGG sin fenol red o HBSS suplementado para experimentos de microscopía óptica.

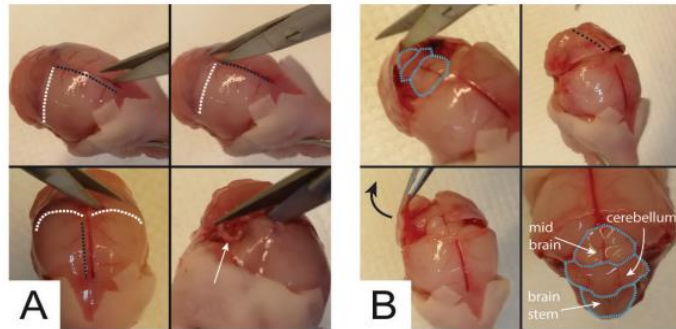
2.4. Cultivos primarios de neuronas de ratones posnatales

Para este proyecto también se ha trabajado con cultivos primarios de células posnatales de ratones de la colonia NDUFS4-KO. En concreto con neuronas cerebelares (CB), neuronas del tronco del encéfalo (BS). Para ello, primero se determina el genotipo de ratones posnatales a día 4-7, ya que para los cultivos nos interesa cultivar en una misma placa pocillos con células aisladas de ratones con el genotipo homocigoto salvaje (WT) como control y, pocillos con células con el genotipo homocigoto knockout para la subunidad NDUFS4 (NDUFS4-KO) como modelo del síndrome de Leigh. Para ello, se trasladan al laboratorio los ratones posnatales y se sacrifican inmediatamente por decapitación en una campana de flujo laminar. Se separan las crías en distintos pocillos de una placa de 24, 12 o 6 pocillos con medio de disección DM (según la medida y número de embriones) y se extrae tejido para genotipar (o bien de la punta de las colas o de un trozo de oreja). Se realiza la extracción de DNA y genotipado, tal como se explica en la sección 1.2.2. Una vez obtenidos los resultados de la PCR en el gel de electroforesis se procede a la disección y el cultivo celular de las crías WT y NDUFS4-KO. Para ello se siguen los siguientes pasos:

1. Se extrae el cerebro utilizando el material de disección y se deposita en una placa de 35 mm con solución de disección y P/E al 1% (una placa de 35 mm para los cerebros extraídos de crías WT y otra para los extraídos de crías NDUFS4-KO) (Figura 32).

Figura 32. Craneotomía para aislar del mesencéfalo, cerebelo y tronco del encéfalo.

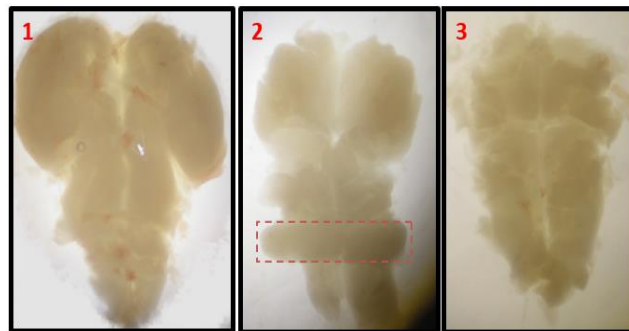
Cortar perpendicularmente hasta el meato acústico **(A)**. Cortar sagitalmente línea de puntos negra **(B)**. Sacar las dos "tapas de hueso" con unas pinzas de micro disección (panel inferior izquierdo de la Figura B). Imagen extraída de (Tehran, D. A., & Pirazzini, M. (2018)) [352].



2. Con la ayuda de la lupa binocular se separan los hemisferios y el cerebelo del tronco del encéfalo y se extraen los vasos sanguíneos y las meninges de cada una de las regiones cerebrales aisladas. En función del número de placas a sembrar se extraerán más o menos regiones cerebrales.

Figura 33. Disección de las regiones cerebrales de ratones posnatales.

En las imágenes **(1-3)** se aprecian los diferentes tejidos cerebrales utilizados en los cultivos primarios. **(1)** Cerebro entero aislado donde se diferencian claramente los hemisferios corticales y el tronco encefálico, **(2)** Región cerebral en la que se aprecia el cerebelo seleccionado en rojo y **(3)** Tronco encefálico.



3. Se traspasan las regiones cerebrales a una placa de 35 mm con solución de disección sin P/E y, de aquí a un tubo de plástico con la base redondeada.
4. Para disgregar enzimáticamente el tejido se hace una incubación de 20 minutos a 37°C con 2 ml de la solución enzimática (E) previamente descongelada.
5. Tras el periodo de incubación se elimina toda la solución enzimática posible mediante dos lavados con 2 ml de DM + K, en el segundo lavado antes de eliminar el medio se centrifuga a 1000 rpm 3 minutos.
6. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el tejido en 2 ml de DM + K mediante una pipeta p1000 para disgregar mecánicamente pipeteando arriba y abajo de forma rápida unas 25 veces.

7. Se añaden 2 ml más de medio DM + K y se deja reposar el tubo para que sedimenten al fondo del tubo los fragmentos de tejido no disgregado. Tras 5 minutos se pasa a un tubo cónico de 15 ml y se repite el paso anterior. Finalmente, se termina con un volumen final de 8 ml.
8. Se centrifuga el tubo cónico con los 8 ml a 1000 rpm 7 minutos.
9. Se descarta el sobrenadante e inmediatamente se resuspende el pellet en los ml de medio de cultivo correspondientes; en el caso de la región del tronco encefálico se disgrega en un volumen final de 5 ml (1BS- 5 ml NBA (1%)) y, en el caso de la región cerebelar se disgrega un volumen final de 7 ml (1CB- 7 ml NBA (1%) suplementado con KCl 25 mM).
10. Se siembran las células en las placas previamente preparadas con el *coating* (0,5 ml/placa de 24 pocillos, 0,25ml/placa de 48 pocillos y 0.3ml/placa de 96 pocillos). O bien, 5 ml/ frasco de 75cm². En las placas de 24 y 48 pocillos se añaden directamente otros 0,5ml/placa de 24 o 0,25ml/placa de 48 de medio fresco NBA (1%) suplementado o no con KCl 25 mM. De esta manera se dejan las células en el incubador a 37°C y un 5% de CO₂ hasta día in vitro 4 (DIV4) sin realizar ningún cambio de medio.
11. A las neuronas cultivadas in vitro 4 días (DIV4) se les añade medio fresco NBA (1%) suplementado o no con KCl 25 mM con el inhibidor de la mitosis “AraC” a una concentración final de 1,2 mM. 0,15-0,5-1 ml para placas de 96-48-24 pocillos, respectivamente. En el caso de las placas de 96 se eliminan 0,15 ml de medio antes añadir el medio fresco con el “AraC”.
12. A días in vitro 7-9 (DIV7-9) se hacen los respectivos experimentos. Dependiendo del tipo de experimento se cambiará el medio en el que estaban. Las neuronas se cambiarán por el medio TM_{ITS} o TM_{ITS} bajo en glucosa y alto en KCl + FBS 2% para transfecciones o tratamientos, respectivamente. Y, para experimentos de microscopía óptica se utilizará HBSS suplementado o SGG sin fenol red y bajo en glucosa.

2.5. Cultivos primarios de astrocitos y microglía de ratones posnatales

Los cultivos primarios de astrocitos y microglía se han aislado a partir de regiones del córtex cerebral de ratones posnatales. Para ello, se ha seguido el protocolo establecido para los cultivos primarios de neuronas de ratones posnatales (Sección 2.4.), exceptuando algunos puntos:

2. Con la ayuda de la lupa binocular se separan los hemisferios y el cerebelo del tronco del encéfalo y se extraen los vasos sanguíneos y las meninges de cada una de las regiones cerebrales aisladas (Figura 33).
4. Se hacen 2 incubaciones de 20 minutos a 37°C con 2 ml de la solución enzimática (E) previamente descongelada.
9. Se descarta el sobrenadante e inmediatamente se resuspende el pellet en los ml de medio de cultivo correspondientes (4 córtex- 10 ml DMEM high glucosa 10% FBS).
10. Se siembran las células en las placas previamente preparadas con el coating (0,5 ml/placa de 24 pocillos, 0,25ml/placa de 48 pocillos y 0.3ml/placa de 96 pocillos). O bien, 5 ml/ frasco de 75cm². En los frascos de 75cm² se añaden otros 10 ml de medio fresco DMEM high glucosa 10% FBS. De esta manera se dejan las células en el incubador a 37°C y un 5% de CO₂ hasta día in vitro 4 (DIV4) sin realizar ningún cambio de medio.
11. Se cambia el medio del frasco de astrocitos y microglía por DMEM high glucosa 10% FBS fresco cada 2-3 días hasta el día 7-8 (Figura 34).
12. Los frascos de 75cm² a los 8 días presentan confluencia con la microglía superpuesta en la capa de astrocitos (Figura 35). Por lo que para separar la microglía se agita a 400 rpm durante 4 horas en un agitador orbital (sin cambiar el medio los 3 días previos). Se centrifuga el medio 1000 rpm 7 minutos y se siembran las células (microglía) a 50.000 cel/ml p48 (1 ml volumen final). Para cultivar los astrocitos, se enjuaga la capa confluyente del frasco con 10 ml de PBS1X previamente atemperado y se agregan 5 ml de tripsina-EDTA e incuban en la incubadora de CO₂ a 37°C 5 minutos. Para comprobar el desprendimiento de astrocitos se golpea el matraz (2-3 veces) y se agregan 5 ml de medio de cultivo de astrocitos. Se centrifugan las células

tripsinizadas 1000 rpm durante 5 minutos, y se siembran en placas a 80000 células/ml.

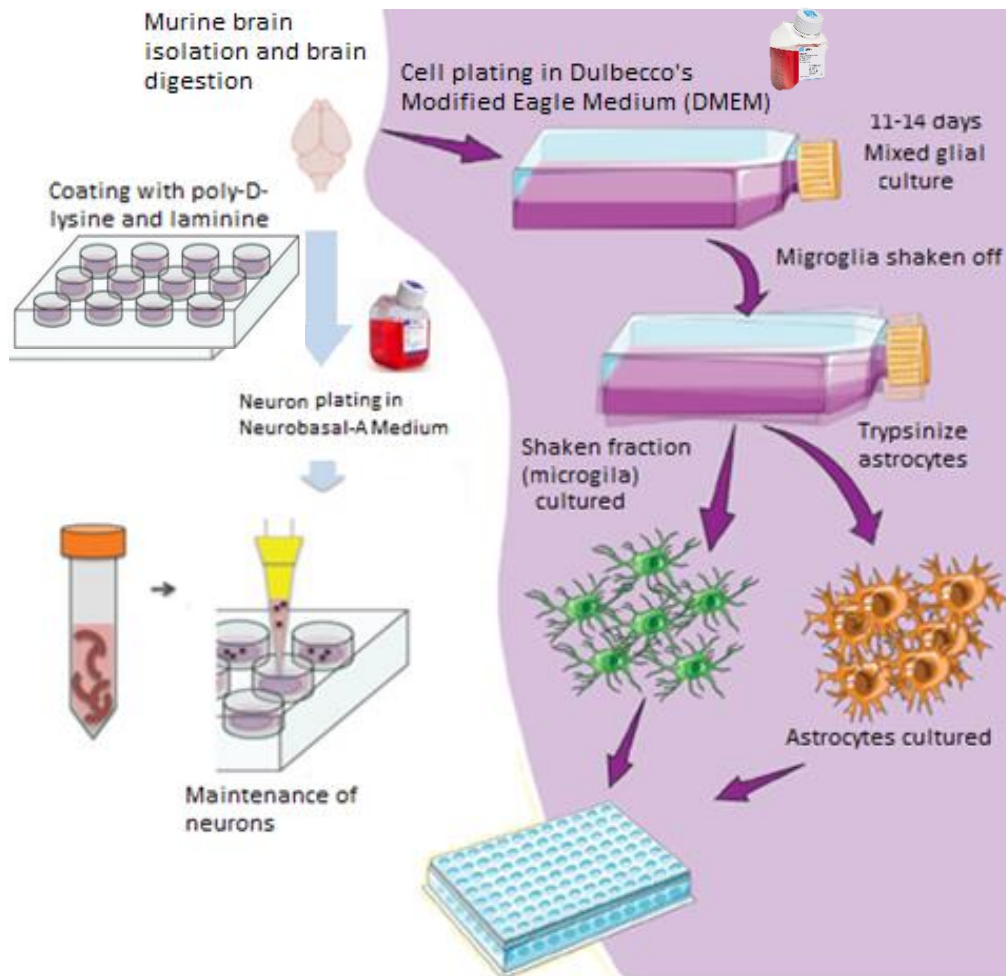


Figura 34. Esquema de procesos a seguir para el cultivo primario de células aisladas de tejido cerebral. Imagen adaptada de (Beaudoin, G. M, et al. 2012) y (Milner, M. T, et al. 2022) [353, 354].

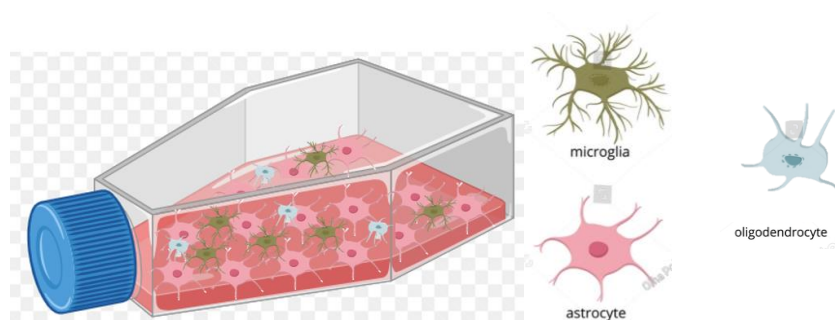


Figura 35. Ejemplo glía en cultivo. Se disponen la microglía y los oligodendrocitos encima de la monocapa de astrocitos.

2.6. Tratamiento con el inhibidor de la mitosis “AraC”

Para inhibir la replicación y crecimiento de las células no neuronales y así obtener cultivos neuronales primarios lo más puros posible, se tratan las células con arabinósido de citosina (AraC), un antimetabolito análogo a la pirimidina. Este fármaco antineoplásico bloquea la síntesis de DNA por inhibición competitiva de DNA polimerasa. De esta manera inhibe la mitosis y, por tanto, la proliferación de células no neuronales. Los cultivos primarios neuronales se tratan con AraC de Sigma el día DIV4 a una concentración final de 1,2 mM (stock de AraC preparado a una concentración de 0,24 M).

2.7. Estimulación de la actividad sináptica

En la corteza cerebral se encuentran cuerpos neuronales de diferentes tipos, neuronas piramidales, en forma de hueso o fusiformes, estrelladas, horizontales de cajal y de Martinotti (Figura 36). Estas células nerviosas generan señales excitatorias (en el caso de las neuronas piramidales glutaminérgicas) o inhibitorias (en el caso de las interneuronas gabaérgicas) en una compleja red de conexiones sinápticas. En los cultivos primarios de neuronas corticales de rata, con el objetivo de estimular la actividad sináptica, se aplicó un método preestablecido de desinhibición de la red neuronal [355]. Mediante la aplicación del antagonista de los receptores de GABAA bicuculina (Bic) a una concentración de 50 μ M, y el bloqueador de los canales de K⁺ 4-aminopiridina (4-AP), a una concentración de 250 μ M. La bicuculina dispara los potenciales de acción en el cultivo de forma sincrónica, y el 4-aminopiridina incrementa la frecuencia de los potenciales de acción. Los experimentos se llevan a cabo en el medio TMO (Figura 37).

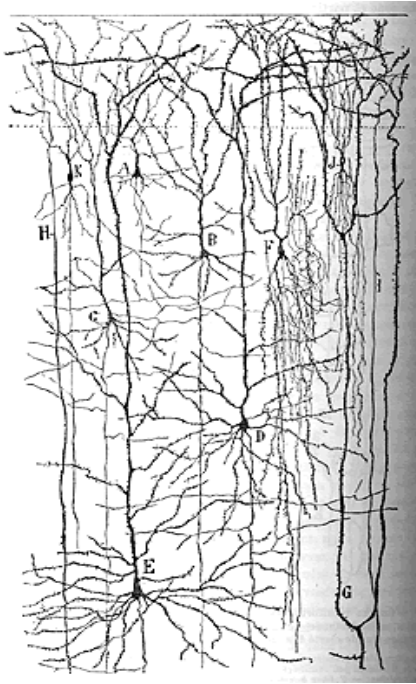


Figura 36. Dibujos de neuronas piramidales neocorticales de Ramón y Cajal 1911.

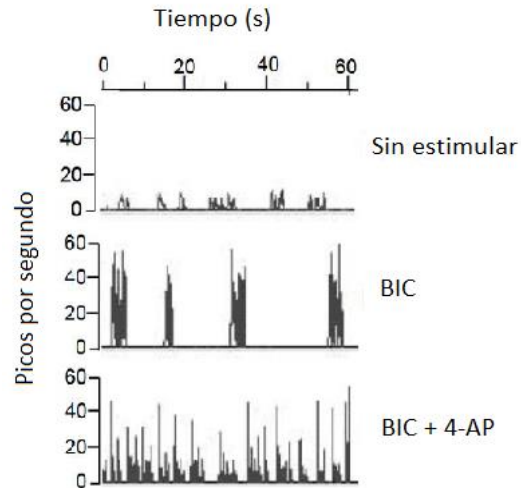


Figura 37. Imagen representativa de la generación y frecuencia de los potenciales de acción generados por tratamientos combinados con Bic y 4-AP. A lo largo de 1 minuto se observan cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Figura adaptada de (Hardingham, Fukunaga & Bading (2002)) [355].

3. Cultivos de líneas celulares

Para la realización de este trabajo también se ha trabajado con líneas celulares continuas. Trabajar con líneas celulares presenta una facilidad a la hora de obtener grandes cantidades de células, debido al hecho de que las células se dividen continuamente sin tener que depender de una fuente externa como es el caso de los cultivos primarios. Además, trabajar con estas células tiene la ventaja de que se pueden congelar y conservar durante largos periodos de tiempo, manteniendo las mismas características que antes de la congelación. No obstante, también presentan limitaciones respecto a la aplicabilidad fisiológica, ya que han perdido las características fenotípicas propias del tejido de procedencia.

La manipulación de líneas celulares se ha llevado a cabo en condiciones de esterilidad en cabinas de flujo laminar vertical y se analizaron periódicamente para detectar micoplasmas.

3.1. Líneas celulares

Se ha trabajado con la línea celular Hek293, principalmente para la producción de adenovirus recombinantes, y la línea HeLa y fibroblastos NRK, para la validación de pruebas antes de utilizarlas en los cultivos primarios de neuronas. Las células Hek293 fueron aisladas de riñón de embrión humano y transformadas con DNA procedente de adenovirus tipo 5 (Ad5) por el Dr. Graham [356]. Se obtuvieron de la ATCC (cat. CRL-1573) y se mantuvieron siguiendo las condiciones generales de cultivo. Las células epiteliales humanas HeLa fueron proporcionadas por Daniel Carbajo (Química combinatoria, PCB). Los fibroblastos de riñón normal NRK fueron adquiridos de la ATCC (cat. CRL-6509).

3.2. Preparación de medios

Igual que con los cultivos primarios de neuronas, se han usado medios, soluciones o suplementos estériles, ya sea de fábrica o mediante autoclavado o filtrado en membrana de 0,22µm de poro tras su preparación en el laboratorio. Para cada línea celular se ha utilizado un medio diferente:

Hek293:

MEM 1X

10% suero fetal bovino (FBS)

1% L-Glutamina 200 mM

1% de Penicilina (100U/mL)/Estreptomicina (100µg/mL)

1X Aminoácidos no esenciales(100x)

HeLa y NRK:

DMEM 1g/l

10% suero fetal bovino (FBS)

1% L-Glutamina 200 mM

1% de Penicilina (100U/mL)/Estreptomicina (100µg/mL)

Los medios suplementados se conservan a 4°C hasta aproximadamente un mes como máximo. Los detalles de los medios comerciales utilizados y suplementos añadidos para la preparación de los medios y soluciones descritos se pueden consultar en la sección 17.1.

3.3. Manipulación de células

Descongelación de células:

Para empezar a trabajar con líneas celulares es necesario descongelarlas. Las células se encuentran en criotubos dentro de tanques de nitrógeno líquido a -196°C , ya que de esta manera se pueden conservar durante largos periodos (meses-años). Gracias a las propiedades del DMSO, se utiliza este disolvente como crio-protector debido a su capacidad para evitar la formación de cristales de hielo intracelulares durante la congelación. Pero este disolvente a temperatura ambiente es tóxico, por lo que la descongelación de células siempre debe ser rápida, siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se saca el criotubo del tanque de nitrógeno líquido y se coloca inmediatamente en hielo.
2. Se introduce el criotubo en el baño a 37°C durante periodos de pocos segundos y antes de que se descongele del todo, se añade 1 ml del medio correspondiente según la línea celular.
3. Se añade el contenido del criotubo a una botella T-75 con 12 ml de medio atemperado.
4. Se deja la botella T-75 en la incubadora a 37°C y 5% CO_2 durante 3 horas y, pasado ese tiempo de incubación se comprueba con el microscopio que las células se hayan adherido bien. Se retira el medio de la botella y se reemplaza por otros 12 ml de medio fresco y se vuelve a dejar la botella de nuevo en la incubadora.

Mantenimiento y pase de líneas celulares

Es necesario mantener el cultivo en división, evitando la confluencia completa. Para ello, cada 2-3 días se ha llevado a cabo el pase de células de un recipiente de cultivo a otro por tripsinización, y paralelamente se han sembrado las células en placas en las cuales se realizarán los experimentos. En este trabajo se ha puesto como limite el pase X + 12, ya que con el tiempo las células van perdiendo sus características genéticas. Para mantener las líneas se han seguido los siguientes pasos:

1. Se aspira el medio que hay en la botella T-75 y se realiza un lavado con 10 ml PBS 1x, aplicándolo a las paredes para no levantar la monocapa de células.

2. Se aspira el PBS 1x, se añaden 2 ml de solución de tripsina y se incuba durante 2 minutos.
3. Se observa en el microscopio que las células se han despegado. Es importante no alargar demasiado la incubación con tripsina, ya que también puede afectar a la viabilidad de las células.
4. Se añaden 10 ml de medio para diluir la tripsina e inhibir su actividad y se pipetea varias veces para desagregar las células.
5. Con una cámara de Neubauer se realiza el conteo celular (ver sección 14.2.). Cuantificando el número de células por mililitro.
6. Se siembran las células en placas para realizar experimentos y, para mantener la línea, se siembran nuevas botellas T-75 y se dejan en la incubadora a 37°C y 5% CO₂.

Congelación de células

Para mantener las líneas celulares durante largos periodos de tiempo congeladas en nitrógeno líquido, se guardan como stock en criotubos. Y, como se ha comentado con anterioridad, para que estas células mantengan las mismas características genéticas deben de tener un bajo número de pases. Cabe recalcar que, a diferencia de la descongelación, la congelación de células debe hacerse gradualmente y muy controlada para evitar la formación de cristales de hielo intracelulares sin provocar daños a la célula debido a la excesiva deshidratación.

1. Se prepara la solución de congelación (FBS con DMSO al 10% (5,4 ml de FBS y 0,6 ml DMSO) y se deja en hielo.
2. Si se requiere congelar un número concreto de células, se cuantifica la concentración celular mediante la cámara de Neubauer. Se tripsinizan las células tal como se ha descrito en el apartado anterior y la suspensión resultante (10 ml de medio + 2 ml de tripsina) se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos.
3. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet con solución de congelación y se mantiene en hielo.
4. Se reparte la suspensión en diferentes criotubos (1-1,5 ml/tubo). Y se colocan los criotubos en un *cooler* recubierto de propanol para generar una congelación gradual en el ultracongelador a -80°C.

5. Al día siguiente, 24 horas después, se traspasan los criotubos a tanques de nitrógeno líquido a -196°C.

4. Técnicas de manipulación de DNA

Para este trabajo se han utilizado diferentes plásmidos (ver sección 17.4.) que han sido comprados, cedidos amablemente por otros investigadores u obtenidos por creación propia. Por lo tanto, se han llevado a cabo diferentes técnicas de manipulación y modificación del DNA, trabajando siempre con material esterilizado por autoclave para evitar contaminaciones.

4.1. Transformación de bacterias competentes

La transformación bacteriana consiste en un proceso de transferencia horizontal de genes, en el que las células receptoras (bacterias) absorben el DNA exógeno que se encuentra en el entorno extracelular. La transferencia horizontal ocurre de manera natural en algunas bacterias, pero también se puede provocar de manera artificial. Para este trabajo se ha utilizado esta técnica para seleccionar los plásmidos recombinantes que nos interesan y amplificarlos extensamente gracias a la maquinaria de replicación de DNA propia de las bacterias. De esta manera, tras la purificación se dispondrá de plásmido suficiente para transfectarlo en las células de estudio.

Para la transformación bacteriana se han utilizado bacterias competentes de la cepa JM109 *Escherichia Coli* de Promega y se ha trabajado bajo esterilidad mediante un mechero Bunsen. Los pasos a seguir han sido los siguientes:

1. Se añaden 40 µl de bacterias competentes en un eppendorf estéril y se añade el plásmido con el que se quieren transformar (10-50 ng, diluidos en un volumen entre 1-10 µl). Excepto para productos de ligación (ver sección 4.6.), en el que se añade todo el volumen de la reacción (10 µl) para garantizar la transformación.
2. Se mezcla suavemente mediante agitación y se mantiene en hielo durante 30 minutos. Durante este tiempo de incubación el plásmido se adhiere a la superficie de la bacteria.

3. Se lleva a cabo un choque térmico a 42°C durante 1 minuto. Y rápidamente se devuelven las bacterias al hielo durante 2 minutos.
4. Se añade 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incuba durante 1 hora a 37°C en agitación. Durante este tiempo las bacterias que hayan incorporado el plásmido empezaran a expresar la resistencia al antibiótico para el que son resistentes.
5. Se siembran 50-100µl de bacterias transformadas en una placa de LB-agar con el antibiótico correspondiente, para así seleccionar solo las bacterias que se han transformado. Para productos de ligación, previamente se concentra el cultivo por centrifugación a 1000 rpm durante 2 minutos, y se siembra todo el contenido.
6. Se incuba la placa sembrada a 37°C durante 24 horas aproximadamente.

4.2. Amplificación de DNA plasmídico

Mediante una punta de pipeta estéril se toma una colonia aislada y se tira la punta a un matraz estéril con medio LB y el antibiótico correspondiente (el volumen del medio vendrá determinado según el kit que se vaya a utilizar para la extracción y purificación del plásmido). En el caso de productos de ligación se toman varias colonias para así evitar tomar colonias satélite, bacterias sin el plásmido de interés pero que han crecido aprovechando la resistencia producida por las colonias cercanas. Por lo que, en este caso, antes de amplificar el plásmido, este se deberá purificar y, mediante comprobación de secuencias de DNA (ver sección 4.5.), determinar que es el plásmido de interés. Se deja el matraz con LB + antibiótico agitando a 37°C hasta el día siguiente, para incrementar el número de bacterias transformadas y así obtener más cantidad de plásmido para la posterior purificación.

* Para poder volver a amplificar en un futuro el plásmido de interés, se deben mantener las bacterias transformadas en un ultracongelador a -80°C (850 µl de suspensión bacteriana + 150 µl de glicerol). De esta manera se dispondrá de ellas durante largos periodos de tiempo (meses-años). El glicerol a concentraciones bajas (0,1-1%) reducirá la formación de cristales de hielo en las bacterias.

4.3. Extracción y purificación de DNA plasmídico

Una vez amplificado el plásmido de interés, se debe seguir con los pasos de aislamiento y purificación de este para poder utilizarlo en las células eucariotas. Para ello, el plásmido se purifica en 0,5 ml de agua libre de nucleasas mediante kits comerciales con protocolos establecidos y optimizados para ello. El plásmido se encuentra en bacterias transformadas que han sido incubadas en LB + antibiótico a 37°C en agitación para que, mediante la maquinaria de replicación de DNA bacteriana, se generaran un gran número de copias de este plásmido (dependiendo de la cantidad de DNA plasmídico que se quiere obtener varía el volumen del medio de incubación, para una cantidad de 0,1-0,2 µg/µl se utilizan 5ml de LB, para 0,3-0,5 µg/µl se utilizan 50 ml y, finalmente, para obtener una cantidad de 1-1,2 µg/µl se utilizan entre 200 y 250 ml). Por lo que para aislar y purificar el plásmido se lisan las células con una solución alcalina y se aísla el material genético con una membrana de silicio utilizando los siguientes kits:

GenElute™ Plasmid Miniprep Kit de Sigma

Se utiliza este kit para obtener pequeñas cantidades de plásmido (0,1-0,2 µg/µl), cuando se está caracterizando o manipulando el plásmido. Las bacterias a partir de las cuales se extrae el plásmido en 5 ml de medio LB + antibiótico.

HiSpeed Plasmid Midi Kit de Qiagen

Se utiliza este kit para obtener cantidades de plásmido (0,3-0,5 µg/µl), cuando se necesita obtener plásmido para transfectar células eucariotas. Las bacterias a partir de las cuales se extrae el plásmido crecen previamente en 5 ml de medio LB + antibiótico para iniciar el crecimiento durante 8h y luego se pasan a 50 ml de medio LB con antibiótico.

HiSpeed Plasmid Maxi Kit de Qiagen

Se utiliza este kit para obtener cantidades de plásmido (1-1,2 µg/µl), cuando se necesita obtener plásmidos muy utilizados en las transfecciones de células eucariotas o para trabajar con virus adenoasociados. Las bacterias a partir de las cuales se extrae el plásmido crecen previamente en 5 ml de medio LB + antibiótico para iniciar el crecimiento durante 8h y luego se pasan a 200 ml o 250 ml de medio LB con antibiótico.

Cuantificación de DNA

Después de aislar y purificar el DNA plasmídico se debe cuantificar mediante lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN) y la placa NanoQuant (TECAN) siguiendo los siguientes pasos:

1. Se añade 2 µl de agua libre de nucleasas por micropocillo para limpiar la superficie de cristal a través de la cual se realiza la lectura.
2. Se mide el “blanco” en 1 µl de agua libre de nucleasas por micropocillo.
3. Se añade 2 µl del plásmido de interés por micropocillo y se realiza la medida de la absorbancia a A260 y A280 para calcular la concentración de plásmido y la pureza del mismo.
4. Se lavan los micropocillos con 2 µl de agua libre de nucleasas.

Este procedimiento también es aplicable a la cuantificación de RNA, pero en el paso 3 utilizando la opción pertinente del software del lector de placas.

4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”)

La PCR es una técnica de biología molecular utilizada para amplificar fragmentos de DNA y, así crear millones o miles de millones de copias a partir de unos pocos fragmentos de DNA. Para ello, se utiliza un termociclador programado para que realice las distintas fases de la reacción, ajustando la temperatura, tiempo y número de ciclos adecuados. Y, para que se realice la reacción es necesario que el DNA este disuelto en una solución de sales con DNA polimerasa, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y secuencias de cebadores (primers) complementarias a las hebras de DNA que se quieren amplificar.

4.5. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica en la que, al aplicarse una corriente eléctrica a una matriz de gel cargada con DNA, los fragmentos de este se separan a través de la matriz en función de su tamaño. La carga negativa propia del DNA hace que este migre hacia el ánodo o polo positivo y, en función de su tamaño, los fragmentos de DNA pasaran con mayor o menor dificultad entre los poros del gel. La concentración del gel de agarosa dictará el tamaño de los poros. A mayor concentración de agarosa (1-1,5%

(p/v)) se generarán poros más pequeños, lo que permitirá separar mejor fragmentos pequeños de entre 400 y 6000 pb entre sí, y a menor concentración (0,5-0,8% (p/v)) se separaran mejor fragmentos de más de 6000 pb.

Para su preparación y carga de las muestras, se han seguido los siguientes pasos:

1. Se pesa la cantidad de agarosa necesaria (ej. Para un gel de 50 ml al 1,8% (p/v), se pesan 0.9g de agarosa). Por tanto, se mezclan los 0.9g de agarosa en un Erlenmeyer de 150 ml con 50 ml de TAE 1X.
2. Para que se disuelva la agarosa se calienta en un microondas hasta que haya quedado completamente disuelta y, con la ayuda de un guante aislante térmico, se saca del microondas. Se tapa el Erlenmeyer con un vaso de precipitados para evitar evaporación del volumen.
3. Se deja enfriar la solución, hasta aproximadamente 40°C. Mientras se enfría la solución, se prepara el molde donde se va a verter la solución para que polimerice.
4. Cuando el Erlenmeyer se puede sujetar sin quemarse se añaden 2,5 µl de GelRed de Biogen, se mezcla por agitación y se vierte en el molde, colocando después el peine para generar los pocillos donde cargar las muestras.
5. Se deja enfriar hasta que polimerice la agarosa y, una vez polimerizado el gel se coloca en la cubeta del equipo de electroforesis horizontal y se añade TAE 1X hasta que el gel queda todo cubierto.
6. Antes de cargar las muestras de DNA, se preparan mezclándolas con el tampón de carga 6X (concentración final 1X). Y se cargan entre 10 y 25 µl. A veces este paso no es necesario, como por ejemplo cuando se utilizan muestras que provienen de una PCR realizada con GoTaq Green, ya que el tampón de carga va incorporado en el propio tampón que se utiliza para realizar la PCR.
7. Se prepara el marcador de peso molecular. Para 12 µl de volumen final de marcador de carga se utilizan: 1 µl de DNA Ladder (Promega), 9 µl de H₂O libre de DNAsas y 2 µl de tampón de carga 6x. Y se cargan las muestras y el marcador de peso molecular (10-25 µl por pocillo).
8. Se tapa la cubeta con la tapa, conectando los electrodos a la fuente de electroforesis, se aplica un voltaje de 100 V y se deja correr el DNA por el gel, sin que las bandas de DNA lleguen a salirse del mismo (aproximadamente 30 minutos).

9. Se observan las bandas en un transiluminador de rayos UV en una cámara oscura (a través de una placa protectora o mediante un sistema de obtención de imágenes acoplado al transiluminador).

Recuperación de fragmentos de DNA

Durante procesos de clonación de DNA (ver sección 4.6.), es probable que se necesite recuperar un determinado fragmento de DNA de un gel de agarosa, para realizar una posterior ligación. Para ello, utilizando una cuchilla se recorta un pequeño rectángulo de gel de agarosa en el punto donde se encuentra la banda de interés observada a través de una placa protectora bajo los rayos UV del transiluminador. Finalmente, se guarda el trozo del gel en un eppendorf y, siguiendo el protocolo incluido en el kit *Wizard® SV Gel and Clean-Up System* utilizado de Promega, se recupera el fragmento de DNA en un volumen de 50 µl de agua libre de nucleasas.

4.6. Clonación de DNA

La clonación de DNA consiste en un conjunto de métodos que se utilizan para insertar una secuencia génica en un plásmido. Por lo que con el objetivo de producir múltiples cantidades de copias de este fragmento se utiliza la maquinaria de replicación de DNA bacteriana. Para ello se deben seguir los pasos de transformación de bacterias competentes (ver sección 4.1.) y extracción y purificación del plásmido (ver sección 4.3.). La estrategia más utilizada es el clonaje de productos de PCR:

Diseño de primers y PCR

El fragmento de DNA de interés que se va a insertar al plásmido es amplificado mediante una PCR (ver sección 4.4. y 1.2.2.). Por lo que los *primers* que amplificaran y clonaran la secuencia génica deben contener una región que sea complementaria a los extremos de la secuencia a amplificar (secuencia de hibridación de 18-21 pb), una secuencia reconocida por la enzima de restricción utilizada en el clonaje (diana de restricción de 6-8 pb) y, unos pocos nucleótidos extra añadidos al inicio para facilitar la posterior digestión de la secuencia amplificada (secuencia cabecera de 3-6 pb).

Aislamiento del producto

Se aísla el producto de PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa utilizando geles de agarosa al 1-1,2% (p/v) comúnmente, dependiendo de la medida de los fragmentos obtenidos y, se recupera el fragmento de DNA (ver sección 4.5.).

Digestión

Antes de proceder a la ligación del producto amplificado, se digieren el inserto y el vector plasmídico al cual será insertado. Para ello se utilizarán enzimas de restricción que generen extremos cohesivos para facilitar la posterior ligación. La digestión tanto del inserto como del vector se realiza incubando en un baño húmedo (la temperatura varía en función la enzima de restricción) durante 1 hora. Cada enzima de restricción tiene un tampón de reacción en el cual su actividad es óptima y, generalmente se utiliza 1U de enzima de restricción por reacción. Excepto si una de las enzimas no tiene una actividad óptima con el tampón de reacción utilizado, en cuyo caso se utiliza entre 1,5 y 2 U de enzima para compensar el déficit de actividad. Teniendo en cuenta que el volumen de enzima no puede superar el 10% del volumen de reacción, dado que las enzimas están disueltas en glicerol, el cual es capaz de inhibir la reacción enzimática.

Finalmente, el DNA digerido se purifica siguiendo el protocolo incluido en el kit comercial *Wizard® SV Gel and Clean-Up System* de Promega.

Tabla 3. Volúmenes de mezcla para la digestión enzimática.

Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Inserto	40µl	Plásmido de clonaje (1 µg)	1-5µl
Enzima de restricción 1	1-2µl	Enzima de restricción 1	1-2µl
Enzima de restricción 2	1-2µl	Enzima de restricción 2	1-2µl
Tampón de reacción	5µl	Tampón de reacción	5µl
Agua libre de DNAsas	Hasta 50µl	Agua libre de DNAsas	Hasta 50µl

Análisis de secuencias de DNA por restricción

En este trabajo se ha utilizado la digestión enzimática también para la comprobación de secuencias genómicas. Para ello, conociendo las dianas de restricción existentes en el

plásmido a comprobar, se incuba con una determinada enzima de restricción y el correspondiente buffer durante 1 hora. Para ello, se utiliza 1 µg de DNA a cortar en un volumen final de 30 µl con 3 µl del buffer correspondiente 10X y 1 µl de la enzima de restricción.

Esta técnica aprovecha las dianas de restricción presentes en el plásmido para generar una serie de fragmentos únicos y, mediante electroforesis determinar si la manipulación de DNA previa ha funcionado o no (ver sección 4.5.). En el caso de la clonación de DNA se escoge una diana que se encuentre en el fragmento clonado y otra en el plásmido utilizado como vector. De esta manera, si el clonaje ha funcionado se observan dos bandas y si no ha funcionado tan solo se observa una.

Hibridación de Oligos

Los oligonucleótidos (oligos), son fragmentos cortos de DNA o RNA que se unen entre sí para formar polímeros biológicos. Por lo que, para obtener un fragmento de DNA concreto, se pueden utilizar oligonucleótidos monocatenarios de DNA complementarios entre sí, diseñados específicamente para obtener una secuencia bicatenaria (inserto) mediante la hibridación de estos. Los pasos a seguir para la hibridación son los siguientes:

1. Resuspender los oligos en Agua libre de DNAsas a una concentración final de 100 uM.
2. Combinar 5ul de oligo directo + inverso.
3. Añadir 8ul de agua y 2ul de NEB Buffer 3.
4. Incubar a 95°C durante 4 minutos y dejar a temperatura ambiente 15 minutos.
5. Diluir a 10 nM en hielo (añadir 0,4 ul de oligos a 1 ml de 1x NEB Buffer.
6. Conservar a -20°C

Ligación

Como último paso en la clonación del DNA se lleva a cabo la ligación, la cual consiste en unir el fragmento de interés con el vector plasmídico. Para ello, se utiliza la ligasa del bacteriófago T4 (Promega) y se deja a 4°C durante toda la noche. Es necesario realizar un control negativo también, en el que no se añade el inserto.

Tabla 4. Volúmenes de mezcla para la ligación.

Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Inserto	7µl	Oligos hibridados	2µl
Plásmido digerido	1µl	Plásmido digerido	2µl
Tampón de reacción (10X)	1µl	Tampón de reacción (10X)	1µl
T4 DNA ligasa	1µl	T4 DNA ligasa	0,5µl
		Agua libre de DNAsas	4,5µl

Pasadas 12-24 horas el producto de ligación se utiliza para transformar bacterias competentes (ver sección 4.1.) y, de las colonias positivas obtenidas se realiza una miniprep (ver sección 4.3.). Para comprobar que la ligación se ha producido correctamente se comprueba la construcción de DNA generada mediante un análisis por restricción o la técnica de secuenciación (ver sección 4.5. y 4.7.).

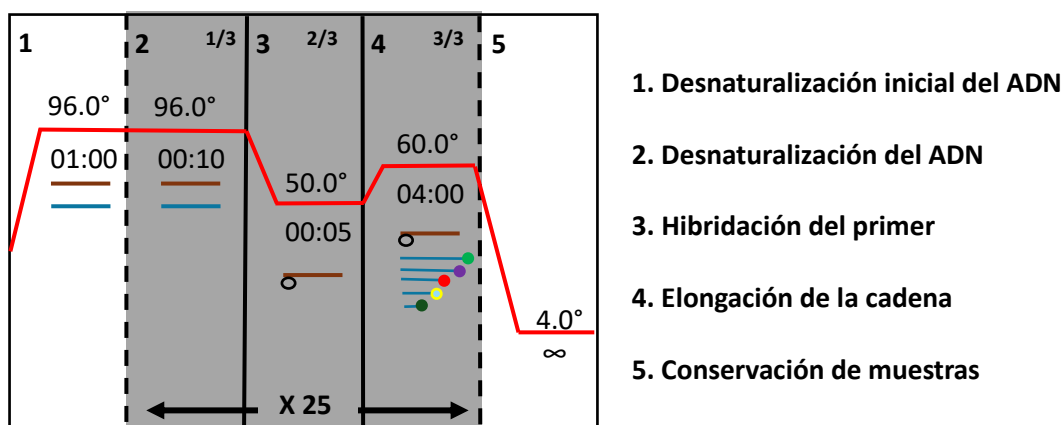
4.7. Secuenciación

Para determinar la secuencia de nucleótidos de un fragmento de DNA se ha utilizado el método de Sanger. Para ello, se ha seguido el kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* de Applied Biosystems. Este método consiste en utilizar la técnica de PCR para insertar ddNTPs marcados con fluorescencia durante la síntesis de la nueva cadena de DNA, deteniendo así la síntesis la nueva cadena. De esta manera se obtienen fragmentos de diferentes tamaños acabados en ddNTPs que se envían al servicio de Genómica de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona para ser analizados y procesados.

Tabla 5. Preparación de la muestra para secuenciar.

Componente	Cantidad
DNA 100ng (1000pb)	Xµl
Primer 5 µM	1µl
Enzima BD3.1	1µl
Tampón BD3.1	3µl
Agua libre de DNAsas	Hasta 20 µl

Tabla 6. Condiciones del termociclador para secuenciar.



Se puede incrementar el número de ciclos a 35 para obtener más señal. La temperatura de hibridación variara en función del plásmido utilizado.

4.8. Transfección celular transitoria

Para incorporar material génico externo en células eucariotas se ha llevado a cabo el proceso conocido como transfección celular transitoria. Se utiliza esta técnica con el objetivo de producir o eliminar la expresión de una proteína durante un tiempo determinado para estudiar su funcionalidad en dichas células. En una transfección transitoria el DNA exógeno no se incorpora en el genoma de la célula, sino que pasa a través de la membrana plasmática hasta llegar al núcleo y lograr ser transcrito, por lo que la proteína codificada se pierde durante un lapso de 24-96 horas. En el caso de utilizar RNA de interferencia (siRNA), el cual tiene un tiempo de vida corto, el silenciamiento de la proteína de interés también es durante un tiempo determinado.

Para este trabajo se ha utilizado el reactivo comercial *Lipofectamine™ 2000* de Invitrogen. Este reactivo contiene una mezcla de lípidos catiónicos que en medio acuoso forman vesículas esféricas con carga superficial positiva llamadas liposomas. Estos liposomas atrapan el material génico a transfectar y se unen a la membrana plasmática de la célula eucariota por endocitosis, permitiendo así el paso de material génico a través de la membrana. La lista de plásmidos o RNA de interferencia utilizados están descritos en la sección 17.4. y 17.6.

Transfección de líneas celulares

Los pasos que se han seguido para transfectar líneas celulares son los siguientes:

1. Se cambia el medio de DMEM de las células a transfectar por OptiMEM sin suplementar atemperado previamente a 37°C (1ml por pocillo de placa de 24).
2. Por cada pocillo de placa de 24 a transfectar se añaden en un tubo de 15 ml 0,5 ml de medio OptiMEM.
3. Se añade el volumen correspondiente de cada plásmido (máximo 1 µg) o siRNA (25 ng).
4. Se añade la LipofectamineTM2000 (3µl por pocillo), se mezcla el contenido y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Después de la incubación, se mezcla de nuevo y se añaden 0,5 ml a cada uno de los pocillos a transfectar.
6. Se incuba durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Y, después de la incubación, se aspira todo el contenido y se reemplaza por medio DMEM suplementado.
7. Se vuelven a dejar las células a 37°C y 5% CO₂ durante 48 horas.

Transfección de cultivos neuronales

Los pasos que se han seguido para transfectar cultivos primarios neuronales (con una eficiencia del 5%) son los siguientes:

1. Dos horas antes de llevar a cabo la transfección, se cambia el medio de NBA (1%) por medio TM_{ITS} (el medio NBA, bajo condiciones de esterilidad, se guarda a 37°C).
2. Se prepara una master mix con la solución de DNA + Lipofectamina a transfectar: Para una placa de 24 pocillos se añaden en un eppendorf 33 µl de medio TM_{ITS} (de la propia placa) y se añade hasta un máximo de 0,7 µg de DNA, por pocillo a transfectar. En otro eppendorf, se añaden 33 µl de medio TM_{ITS} (de la propia placa) y 2,35µl de LipofectamineTM2000, por pocillo a transfectar.
3. Se añaden 33 µl por pocillo de la solución de LipofectamineTM2000 a la solución de DNA, se mezcla la solución y, se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Después de las dos horas de incubación, se añaden 285 µl por pocillo a la mezcla de DNA + Lipofectamina y se mezcla de nuevo.
5. Se aspira el contenido de los pocillos y se añaden 333 µl de la mezcla de transfección.

6. Se incuba en la incubadora a 37°C y 5% CO₂ durante 2 horas y media y, pasado ese tiempo se aspira el contenido y se vuelve a añadir el medio NBA, previamente guardado, en el que estaban las neuronas antes de la transfección. Se incuban las neuronas en la incubadora a durante 24-72 horas más.

Transfección de cultivos de astrocitos

Los pasos que se han seguido para la transducción de los cultivos de astrocitos son los mismos que para líneas celulares, con algunas diferencias; Se utilizan 2 µl de lipofectamina y 0,5 µg de plásmido por pocillo de 24 a transfectar, en un volumen de 50 µl y, se incuban durante 4 horas en un volumen final de transfección de 400 µl, a diferencia de las líneas que era de 1500 µl.

5. Infección con virus adeno-asociados (AAVs)

Para conseguir una eficiencia de transfección mayor (alrededor del 90%) en cultivos primarios neuronales, se suele trabajar con virus adeno-asociados (AAVs). Los AAVs son una clase de virus no patogénicos que pertenecen a la familia *Parvoviridae*. Estos virus tienen DNA monocatenario sin envoltura y requieren de un virus auxiliar para reproducirse. Esta técnica permite la expresión a largo plazo en células que no se dividen, ya que los AAV son capaces de integrarse en el genoma mediante recombinación homóloga.

5.1. Amplificación de AAVs

Para obtener grandes cantidades de AAVs se transfectan células Hek293 con los siguientes plásmidos:

- pRV1, plásmido que contiene las secuencias Rep y Cap del serotipo AAV2.
- pH21, plásmido que contiene las secuencias Rep y Cap del serotipo AAV1.
- pFΔ6, plásmido que contiene los genes de adenovirus necesarios para la replicación del AAV.
- Plásmido AAV, plásmido que contiene las secuencias génicas de interés flanqueadas por dos secuencias ITR (Repeticiones Terminales Inversas) que actúan como señales

de empaquetamiento. Las secuencias de los *short hairpin* RNAs (shRNAs) incluidos en estos plásmidos se detalla en la sección 17.6.

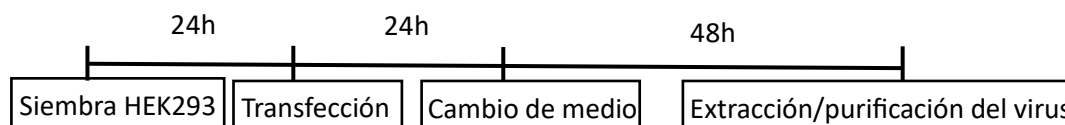


Tabla 7. Preparación de solución a transfectar.

Para 1 T-175	
Plásmido	Cantidad
Plásmido <i>pRV1</i>	6,25 µg
Plásmido <i>pH21</i>	6,25 µg
Plásmido <i>pFΔ6</i>	25 µg
Plásmido AAV	12,5 µg
Lipofectamina (1,5 uL / 1 ug DNA)	75 µl
Medio OptiMEM (sin suplementar)	2500 µl

Los pasos a seguir para amplificar los AAVs se describen a continuación:

1. Se siembran células Hek293 en 5 frascos T-175 en medio MEM suplementado (MEM, 10% FBS, 100 U/ml P/E, 2 mM L-Gln, 1X Aminoácidos no esenciales(100x)).
2. Cuando estén al 80% de confluencia (24-48h después de sembrarlas) se cambia el medio por OptiMEM sin suplementar (25ml/frasco T-175).
3. Se prepara la solución de DNA con los diferentes plásmidos utilizados y la solución de transfección (Tabla 7). No hacer mix común para las 5 botellas T175 porque disminuye la eficiencia de transfección.
4. Se mezcla la solución de transfección y se incuba durante 20 minutos.
5. Se añaden los 2,5 ml de la mezcla a cada frasco T-175 y se incuba a 37 °C y un 5% de CO₂ durante 24 horas.
6. Pasadas 24 horas se aspira el medio y se añaden 40 ml a cada frasco de medio por MEM suplementado. Se vuelven a dejar las células en el incubador durante 72 horas.

A la mañana siguiente se cambia el medio por DMEM con FBS al 10%. (En caso de que el constructo AAV exprese AAV se puede comprobar en el microscopio de fluorescencia si la transfección ha funcionado).

5.2. Extracción, purificación y concentración de AAVs

Para la purificación del virus se ha seguido el siguiente protocolo:

1. Después de las 72 horas de incubación se comprueba que se haya expresado el AAV mediante el microscopio de fluorescencia invertido (en el caso que el plásmido AAV contenga un gen reportero detectable por fluorescencia).
2. Seguidamente, bajo la campana de flujo laminar de seguridad biológica se elimina el sobrenadante y se hace un lavado con 25mL/frasco de PBS 1X 37°C. Es muy importante hacerlo lento y suave para evitar que se desprenda la monocapa.
3. Se añaden otros 20 ml de PBS a cada botella T175 y se desenganchan las células tirando el líquido encima de la monocapa. Como son 5 botellas se obtienen 100 ml finales divididos en dos tubos de 50 ml.
4. Se centrifugan a 600g durante 15 min a 4°C y se descarta el sobrenadante.
5. El pellet celular se resuspende en 25 ml de buffer 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0 y se congela a -20°C toda la noche.
6. Al día siguiente se descongela el pellet a temperatura ambiente y se añade sodium deoxycholate de Sigma a una concentración final de 0.5% (1.25 ml de un stock al 10% preparado en freso) a cada tubo que contiene los 25 ml del pellet descongelado).
7. Se añade Benzonase endonuclease de Sigma a una concentración final de 50 U/ml (1.250 U/25 mL), se mezcla bien y se incuba durante 1h a 37°C en baño a 37°C.
8. Se centrifuga a 3000g x 15min, 4°C para eliminar los debris.
9. Se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio (tienen apariencia de leche clara) y se guarda a -20°C hasta la purificación.
10. Se descongelan las muestras a temperatura ambiente y se centrifugan a 4°C durante 15min a 3.000g. Una vez culminada la centrifugación, se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo para eliminar todos los “debris”.
11. Dentro de la cabina se monta la columna de heparina *HiTrap® Heparin High Performance* de Sigma y una jeringa de 20 a una bomba peristáltica para que las diferentes soluciones fluyan a través de la columna a un caudal de 1 ml por minuto.
12. Se pasa por la manguera un volumen pequeño del buffer 150 mM NaCl, 20 mM Tris, para evitar que posteriormente entre aire a la columna de heparina equilibra. Y, se equilibra la columna de heparina con 10 ml de 150 mM NaCl, 20 mM Tris.

13. Se cargan 20 ml de la muestra del virus preparada (Repetir este procedimiento hasta que pase toda la muestra). El virus queda retenido en la columna.
14. Se lava la columna con 20 ml de 100mM NaCl, 20 mM Tris.
15. Se eluye el virus como se indica a continuación:

1 x 1 ml 200 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0 - descartar
 1 x 1 ml 300 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0 - descartar
 1 x 1.5 ml 400 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0)
 1 x 3 ml 450 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0)
 1 x 1.5 ml 500 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0)

**Recolectar esta
fracción en un tubo
estéril de 15 ml**

16. Se carga todo el volumen eluido en el paso anterior a las *Amicon ultra-4 centrifugal filter units* de Sigma. Y se concentran las partículas víricas centrifugando a 4°C durante 15min a 3.000g. Tras centrifugar, el virus queda retenido en el filtro y en un volumen pequeño.
17. Finalmente se elimina el líquido residual que atravesó el filtro y en la zona superior del filtro quedan unos 250-300 µl del virus purificado y concentrado. Se hacen alícuotas pequeñas (10-20 µl) y se guardan a -80°C.

5.3. Protocolo de infección

Para comprobar la eficiencia de infección del virus generado, se añaden diferentes cantidades de este a placas de 96 en las que se encuentran las neuronas sembradas. Mediante microscopia de fluorescencia se observa el porcentaje de células infectadas y a partir de ahí se trabaja bajo esas concentraciones.

La infección de las neuronas se lleva a cabo a DIV4 y los experimentos se llevan a cabo tras 4 o 5 días de la infección.

6. Análisis de expresión génica

Los niveles de expresión génica se han llevado a cabo mediante PCR cuantitativa (qPCR). La qPCR es una variante de la PCR que permite amplificar y determinar en tiempo real la cantidad de una determinada secuencia de DNA de cadena doble. Mediante una sonda fluorescente capaz de unirse a la DNA de doble cadena, la DNA polimerasa va amplificando la secuencia de DNA de interés a la vez que la sonda se une a las nuevas

moléculas sintetizadas. Y, tras cada ciclo de amplificación el termociclador realiza una medición de fluorescencia gracias a los sensores que lleva acoplados, dando como resultado un incremento en la intensidad de fluorescencia proporcional a la cantidad de nuevo DNA sintetizado. Por este motivo la cuantificación del DNA se lleva a cabo en la fase exponencial de la amplificación del DNA.

6.1. Aislamiento de RNA a partir de tejido

Para estudiar los niveles de expresión génica en ratones posnatales, primero se debe llevar a cabo el aislamiento de RNA para posteriormente generar DNA complementario (DNAc) que sirva de molde para la qPCR. Para este trabajo se ha utilizado tejido diseccionado de ratones posnatales en estadio p20 y p48 y la extracción de RNA a partir de tejido se ha llevado a cabo mediante el método fenol-cloroformo.

6.1.1. Aislamiento del tejido

1. Se sacrifican los animales por dislocación cervical.
2. Se extrae el encéfalo y se deposita en una placa de Petri con PBS1X a 4°C.
3. Se lleva a cabo la disección del tronco del encéfalo, el cerebelo y las cortezas cerebrales en hielo. Eliminando las meninges en la medida de lo posible.
4. Se congelan las regiones cerebrales en nitrógeno líquido y se guardan a -80°C.

6.1.2. Aislamiento de RNA mediante el método fenol-cloroformo

1. Se deja el tejido congelado a -80°C en hielo durante 5 minutos para que se descongele.
2. Se pesa el tejido. Se utilizan entre 75 y 150 mg de tejido.
3. Se añade al tejido 1 ml del reactivo *TriPure Isolation Reagent* y se mezcla con el vórtex. Este reactivo contiene una solución monofásica con fenol e isocianato de guanidina.
4. Se homogeneiza y disgrega el tejido mediante una P-1000, a continuación, con una P-200 y por último con una jeringuilla 26G.
5. Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añaden 200 µl de cloroformo.

6. Se mezcla la solución con el agitador vórtex y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Se centrifuga a 12000g durante 15 minutos a 4°C y la fase acuosa (la superior) se transfiere a un tubo nuevo (aproximadamente 0,5ml).
8. Se añaden 0,5 ml de isopropanol frío, se mezcla con el agitador vórtex y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Se centrifuga a 12000g durante 10 minutos a 4°C y se descarta el sobrenadante.
10. Se resuspende el pellet en 1 ml de etanol 70% y se mezcla brevemente mediante el agitador vórtex.
11. Se centrifuga a 7500g durante 5 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante.
12. Dejamos los tubos abiertos a temperatura ambiente entre 15 y 30 minutos con el objetivo de que el etanol se evapore.
13. Se resuspende en 30 µl H₂O libre de RNAsas y se mide su concentración (ng/µl) mediante la placa NanoQuant (TECAN) y el lector 200 PRO (TECAN) del mismo modo que se ha detallado con el DNA (ver sección 4.3.).

6.1.3. Limpieza y purificación de RNA

El RNA extraído de tejido es conveniente purificarlo para así eliminar los residuos provenientes de reacciones enzimáticas o sales residuales de procesos de aislamientos de la muestra en los que se ha realizado la extracción del RNA empleando fenol. Para este trabajo se ha utilizado el kit RNeasy MinElute Cleanup Kit de Qiagen siguiendo su protocolo preestablecido, con el objetivo de obtener un RNA con la pureza necesaria para ser empleado en técnicas de qPCR.

6.2. Aislamiento de RNA a partir de cultivos celulares

Para llevar a cabo el aislamiento de RNA en cultivos celulares se ha utilizado el kit *PureLink™ RNA Mini Kit* de Invitrogen, se ha seguido el siguiente protocolo:

1. Se aspira el medio y se añade a cada pocillo Lysis Buffer del PureLink™ RNA Mini Kit con un 1% β-mercaptoetanol para homogeneizar el cultivo (volumen total por condición es de 350µl).

2. Con una punta de P1000 se rasca los pocillos para desadherir las células y se homogeneizan por pipeteo.
3. Se sigue el protocolo preestablecido del kit para aislar el RNA del lisado.
4. Tras aislar el RNA, se mide su concentración con el lector Infinite200PRO (TECAN), del mismo modo que se ha detallado con el DNA (ver sección 4.3.).

En el caso de que la extracción de RNA no se vaya a llevar a cabo inmediatamente se aspira todo el medio de cultivo y se añaden 300 µl de RNAlater a cada pocillo de placas de 24 pocillos bajo condiciones de esterilidad. Se precinta la placa con Parafilm y se deja a 4°C.

6.3. Síntesis de DNAC

Una vez obtenido el RNA ya bien sea de tejido o de células cultivadas, se realiza la retro-transcripción para obtener DNAC. Para la retro-transcripción se han utilizado dos kits:

- Kit *Superscript™ III First-Strand Synthesis Super Mix* de Invitrogen.
- UltraScript™ cDNA Synthesis Kit de PCR BIOSYSTEMS.

Tabla 8. Preparación de la RT Reaction Mix.

Superscript™ III First-Strand Synthesis Super Mix	
Componente	Cantidad
RNA	1000ng
2X RT Reaction Mix	10µl
RT Enzyme Mix	1,5µl
Agua libre de DNAsas	Hasta 20 µl

UltraScript™ cDNA Synthesis Kit	
Componente	Cantidad
RNA	400ng
20X UltraScript™ for cDNA Synthesis	1µl
5X cDNA Synthesis Mix Mix	4µl
Agua libre de DNAsas	Hasta 20 µl

Tabla 9. Condiciones del termociclador para pasar a DNAc.

Temperatura	Tiempo
25 °C	10 min
*	30 min
85°C	**
4°C	∞
37°C	20 min
4°C	∞

* Para el kit *SuperscriptTM III First-Strand Synthesis Super Mix* se utiliza una temperatura de 50°C, mientras que para el kit *UltraScriptTM cDNA Synthesis* se utiliza una temperatura de 42°C.

** Para el kit *SuperscriptTM III First-Strand Synthesis Super Mix* se incuban las muestras a 85°C durante 5 minutos, mientras que para el kit *UltraScriptTM cDNA Synthesis* se incuban a 85°C durante 10 minutos.

6.4. Reacción de qPCR

Finalmente, a partir del DNAc sintetizado se realiza la reacción de qPCR con el fin de analizar la expresión de un gen determinado. Para este trabajo se ha utilizado el kit GoTaq® qPCR Master Mix de Promega y los primers, diseñados mediante el programa *Primer-BLAST* del NCBI, detallados en la sección 17.6.

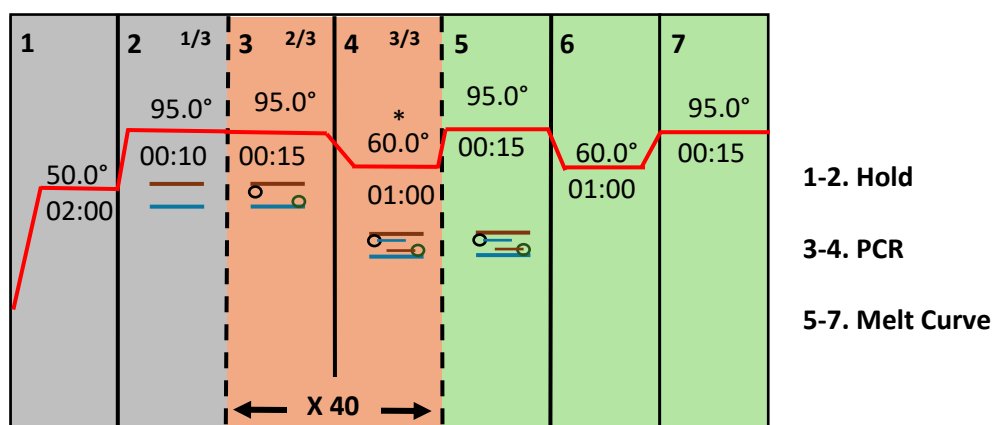
Tabla 10. Preparación de la mezcla de reacción para qPCR.

Componente	Cantidad
cDNA	2µl
Forward Primer 10 µM	1,35µl
Reverse Primer 10 µM	1,35µl
GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	22,5µl
Agua libre de DNAsas	19,8µl

*La mezcla está hecha para cada gen a analizar y por triplicado.

Mediante el termociclador *StepOnePlusTMSystem* de Applied Biosystems se ha amplificado el gen de interés, utilizando como control interno el nivel de expresión del RNA ribosomal 18S.

Tabla 11. Condiciones del termociclador para qPCR.



* La temperatura puede variar en función de la temperatura de fusión de los *primers*.

Inicialmente se incuba la muestra a 95°C con el objetivo de activar la DNA polimerasa. Durante los 40 ciclos siguientes tiene lugar la amplificación del DNA. Por último, se lleva a cabo el análisis de la curva de fusión (*melting curve analysis*) del DNA. Este análisis permite determinar el nivel de especificidad de los *primers* utilizados.

Con el programa *StepOnePlus™ software V2.1* de Applied Biosystems se obtiene un valor de umbral de ciclo (Ct) a partir de la curva de amplificación de cada gen analizado. El valor Ct corresponde al ciclo de amplificación a partir del cual el producto amplificado emite un nivel de fluorescencia detectable.

Para calcular la ratio de expresión del gen en cuestión bajo una determinada condición respecto a su muestra control se realizan los siguientes cálculos:

Primero, mediante la diferencia entre el valor Ct del gen de estudio (Ct_{gen}) y el del control interno (Ct_{18S}) se calcula su expresión relativa en una determinada condición (ΔCt).

$$\Delta Ct = Ct_{gen} - Ct_{18S}$$

Seguidamente, con el valor ΔCt se puede calcular el valor ΔΔCt, mediante la diferencia entre la expresión relativa del gen analizado en una determinada condición (ΔCt_{cond}) y la muestra control (ΔCt_{ctrl}). En el caso de la muestra control ΔΔCt=0.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{cond} - \Delta Ct_{ctrl}$$

Finalmente, se puede calcular la ratio de expresión del gen en cuestión bajo una determinada condición respecto a su muestra control a partir del valor $\Delta\Delta Ct$. Puesto que cada ciclo de diferencia entre dos condiciones se corresponde con la existencia del doble DNA en una muestra con respecto a la otra, se calcula de la siguiente manera:

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

7. Análisis de la actividad transcripcional

El análisis de la actividad transcripcional se ha llevado a cabo mediante el gen reportero luciferasa. Esta enzima cataliza la reacción de oxidación de luciferina a oxiluciferina, emitiendo luminiscencia durante el proceso. Al clonar plásmidos con construcciones compuestas por el gen de la luciferasa *firefly* bajo un promotor de interés (Figura 38), se puede cuantificar el nivel de actividad del promotor basándose en el nivel de actividad luciferasa presente en extractos celulares. Para la detección de la actividad luciferasa se ha transfectado el cultivo celular con plásmidos 48 horas antes de llevar a cabo el experimento y, siguiendo el protocolo establecido del kit comercial utilizado DualGlo® Luciferase Assay System de Promega, se ha medido la luminiscencia producida mediante un luminómetro, en el lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN). Como control de transfección, se ha utilizado la luciferasa Renilla bajo el promotor pEF. Una enzima que cataliza la conversión de coelenterazina en coelenteramida y emite luminiscencia durante el proceso.

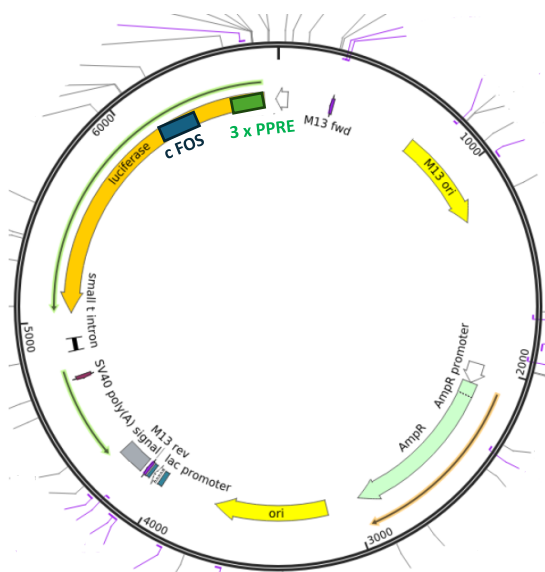


Figura 38. Plásmido unido al gen de la luciferasa *firefly*. Plásmido “PPRE X3-cFOS-luc” reportero de PPAR (sitios 3xDR1 encima del indicador de luciferasa y el promotor basal de cFOS), modificado por digestión enzimática y clonación para que esté bajo el promotor c FOS. Imagen extraída y adaptada de addgene.

8. Western blot

El *western blot* es una técnica analítica empleada para separar e identificar proteínas que se encuentran en tejidos o extractos celulares utilizando anticuerpos específicos. Mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) se separan las proteínas por peso molecular y, seguidamente se transfieren a una membrana de PVD para su posterior detección.

8.1. Extracción de proteína de tejidos

Para estudiar los niveles de expresión proteica en ratones posnatales de estadio p20 y p48, se ha diseccionado el tejido (ver sección 6.1.1.) y se ha llevado a cabo la extracción de proteína en una campana de extracción de gases siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se prepara el tampón de extracción (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl 1.5 mM, 1 mM EDTA, 1% Tritón X-100, Coctel de inhibición de proteasas (Calbiochem) 1:100, Coctel de inhibición de fosfatasa II i III (Sigma) 1:200, MG132 1:1000).
2. Se deja el tejido congelado a -80°C en hielo durante 5 minutos para que se descongele.
3. Se pesa el tejido. Se utilizan entre 75 y 150 mg de tejido. Por cada 0,02g de tejido se añaden 100 µl de tampón de extracción.
4. Se homogeniza el tejido mediante una P-1000, a continuación, con una P-200 y por último con una jeringuilla 26G.
5. Una vez disgregado, se deja entre 1 y 2 horas en agitación a 4°C.
6. Pasado este tiempo se centrifuga a 12000 g durante 20 minutos a 4°C.
7. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se mide la concentración de proteína mediante el kit BSA Protein Assay (23225) (ver sección 10.3.).
8. Se diluye el tampón de extracción hasta obtener la concentración deseada (50-100 µg/100µl) y se le añade el tampón Laemmli 5X y se incuba durante 5 minutos a 95 °C.

8.2. Extracción de proteína a partir de cultivos celulares

Para estudiar los niveles de expresión proteica en extractos celulares procedentes de los cultivos celulares se ha llevado a cabo la extracción de proteína en una campana de extracción de gases siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se prepara el tampón de carga Laemmli 1,5X (Tris 1,5 M pH6,8, glicerol 15%, SDS 3%, β -mercaptoetanol 7,5% y azul de bromofenol 0,0375%) y se calienta a 95°C. Este tampón facilita la lisis celular, desnaturaliza las proteínas y facilita la carga de la muestra en el gel para realizar la electroforesis.
2. Se aspira el contenido de los pocillos donde se encuentran las células y se añade el tampón de carga Laemmli 1,5X (para placas de 24 pocillos se añaden 35 μ l por pocillo).
3. Con la ayuda de una punta azul de pipeta P1000 se rasca la superficie del pocillo, se homogeneiza el cultivo y se transfiere a un tubo Eppendorf. De esta manera se lisan las células.
4. Se hace un spin y se calienta la muestra a 95°C durante 5 minutos desnaturalizar las proteínas.
5. Se guardan las muestras a -20°C. Antes de cargar las muestras se vuelven a hervir 5 minutos más a 95°C para asegurar la desnaturalización de las proteínas.

8.3. Electroforesis SDS-PAGE

Seguidamente, se separan las proteínas por peso molecular en un gel de poliacrilamida con SDS mediante la técnica conocida como electroforesis. Al aplicar una diferencia de potencial las proteínas migran a lo largo del gel hacia el polo positivo y se separan únicamente en función de su peso molecular, dado que el detergente SDS elimina las estructuras secundarias y terciarias y confiere a la proteína carga negativa. La capacidad de migración de las proteínas dependerá del tamaño de los poros en el gel de poliacrilamida, que a su vez vienen determinados por el porcentaje de poliacrilamida que compone el gel (en un gel con un porcentaje alto de poliacrilamida se separaran mejor proteínas de bajo peso molecular, y viceversa).

Por lo tanto, para la realización del SDS-PAGE se utiliza un gel con dos concentraciones diferentes de poliacrilamida en un gradiente de pH. El gel de empaquetamiento superior, en el cual se concentran y alinean las proteínas antes de su separación, tiene un pH bajo y un tamaño de poro grande (determinado por una concentración de poliacrilamida generalmente al 4%). Y, el gel de separación inferior, en el cual se lleva a cabo la separación, tiene un pH alto y un porcentaje de poliacrilamida que depende del grado de resolución deseado (oscila entre 7,5-12%).

Para identificar los pesos moleculares de las proteínas que a analizar se ha utilizado el sistema *Mini-PROTEAN Tetra Cell* de Bio-Rad siguiendo los siguientes pasos:

1. Se prepara el gel de separación como se indica en la tabla 12 en un volumen final de 10 ml y se vierte entre los dos cristales donde se polimerizará el gel, dejando libre la parte superior.
2. Se prepara el gel de empaquetamiento como se indica en la tabla 13 en un volumen final de 5 ml y se vierte en la parte superior de los cristales, colocando el peine que actúa como molde de los pocillos.
3. Se prepara el tampón de electroforesis 1X, diluyendo el stock 10X en agua Milli-Q.
4. Se monta el sistema de electroforesis y se carga la muestra proteica (entre 15 y 100µg de proteína en un volumen de entre 15 y 40 µl) en los pocillos. También se carga un marcador de peso molecular Spectra BR de Thermo Scientific™ (entre 3,5 y 7 µl) para identificar los pesos moleculares de las proteínas separadas.
5. Para que migren las proteínas a través del gel se conectan los electrodos y se aplica una diferencia de potencia de 110 V. cuando el azul de bromofenol llegue hasta la parte inferior del gel se para la electroforesis.

Tabla 12. Componentes del gel separador a diferentes % de poliacrilamida.

Gel separador (10ml)							
Porcentaje	5%	7,5%	9%	10%	12%	13%	15%
Agua Mili-Q	5,45 ml	4,7 ml	4,3 ml	4 ml	3,25 ml	2,9 ml	2,3 ml
Tris 1,5M (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS (10%)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Poliacrilamida (30%)	1,7 ml	2,5 ml	3 ml	3,3 ml	4,08 ml	4,5 ml	5 ml
APS	90 µl	90 µl	90 µl	90 µl	90 µl	90 µl	90 µl
TEMED	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl	9 µl

Tabla 13. Componentes del gel de empaquetamiento al 4% de poliacrilamida.

Gel de empaquetamiento (5ml)	
Porcentaje	4%
Agua Mili-Q	3,05 ml
Tris 0,5M (pH 6,8)	1,25 ml
SDS (10%)	50 µl
Poliacrilamida (30%)	0,65 ml
APS	90 µl
TEMED	9 µl

8.4. Transferencia de proteínas a la membrana

Después de separar las proteínas en el gel de poliacrilamida es necesario transferirlas a una membrana para poder proceder con la detección por anticuerpos. Para este trabajo se ha utilizado el método de electrotransferencia mediante el sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad, el cual consiste en transferir proteínas a una membrana mediante una corriente eléctrica. Los pasos seguidos son los siguientes:

1. Se prepara el tampón de transferencia (700 ml agua Mili-Q, 200 ml metanol, 100 ml tampón de transferencia 10X).
2. Se recorta una membrana del tamaño del gel de separación (en este trabajo se han utilizado membranas de poli-vinileno (PVDF) *Immobilon-P* de Merck) y dos trozos de papel *Whatman* de una medida un poco mayor a la del gel.
3. Se extrae el gel del sistema de electroforesis y se descarta el gel de empaquetamiento.
4. Se incuba la membrana de PVDF en metanol durante 1 minuto para activarla, se sumerge en agua destilada para eliminar el exceso de metanol y se deja en tampón de transferencia.
5. En un recipiente con tampón de transferencia se prepara el “sándwich” de transferencia (el gel de electroforesis y la membrana de PVDF empaquetados en un *cassette*, con papel de Whattmann y una esponja en ambos lados para asegurar que quede bien pegada la membrana al gel).
6. Se eliminan las burbujas entre el gel y la membrana pasando un rodillo por encima y se introduce el *cassette* en la cubeta de transferencia. Las proteínas migran del gel a la membrana al desplazarse del polo negativo (negro) hacia el polo positivo (rojo),

por lo que hay que tener en cuenta que al colocar el *cassette*, en el polo negativo tiene que estar primero el gel y, seguidamente la membrana.

7. Se coloca un bloque de hielo dentro de la cubeta (para evitar que se caliente el sistema) y se añade el tampón de transferencia hasta cubrir todo el *cassette*.
8. Se aplica una diferencia de potencia de 75 V durante 90 minutos.

8.5. Bloqueo de la membrana

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF es necesario bloquear los lugares que han quedado libres de proteína para que, en el paso posterior de detección mediante anticuerpos, éstos no se unan a la membrana de manera inespecífica. Para ello se lleva a cabo el proceso de bloqueo de la membrana mediante la incubación de esta en una solución rica en proteínas (proteína albúmina sérica bovina (BSA) o leche desnatada). En este trabajo el bloqueo de la membrana se ha llevado a cabo mediante incubación la solución de bloque (TBS 1X con leche desnatada en polvo al 5%) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

8.6. Inmunodetección

El paso final del *Western blot* consiste en la detección de la proteína de interés mediante un anticuerpo específico contra la misma. Para ello, se utiliza un anticuerpo primario específico contra dicha proteína y un anticuerpo secundario contra el primario, y conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP), la cual cataliza la oxidación del luminol y genera una pequeña cantidad de luz que puede ser detectada con films fotográficos o una máquina para imágenes de *western blot*.

Para la inmunodetección de una proteína específica se ha seguido el siguiente protocolo:

1. Después del bloqueo, se vuelve a incubar la membrana con un anticuerpo específico para una determinada proteína. Para ello deja la membrana durante toda la noche a 4°C en agitación orbital con el anticuerpo primario a la concentración que corresponda (ver sección 17.5.) preparado en 2 ml de solución de bloqueo (se reutiliza la solución del anticuerpo primario hasta que se empieza a notar que su actividad no es tan eficaz).

2. Al día siguiente se realizan 3 lavados de 5 minutos en agitación con la membrana a temperatura ambiente en TBS + Tween 0,05% (TBST).
3. Seguidamente se incuba la membrana durante 1 hora en agitación en 10 ml de solución bloqueo con 3,5 µl del anticuerpo secundario correspondiente (ver sección 17.5.).
4. Se vuelven a realizar 3 lavados de 5 minutos en agitación con la membrana a temperatura ambiente en TBST.
5. Se incuba la membrana con el reactivo *Clarity™ Western ECL Substrate* de Bio-Rad (solución 1:1) durante 1 minuto.
6. Rápidamente se detecta la luminiscencia emitida mediante el revelado manual, exponiendo la membrana a un film fotográfico (X-Ray film de AGFA) en una cámara oscura y revelando los films en una solución reveladora y, seguidamente, una solución fijadora, o bien, mediante adquisición de imágenes con el sistema *ChemiDoc Imaging System* de BioRad.

8.7. Borrado de la membrana

En el caso de que se necesite identificar más de una proteína en la misma membrana, al finalizar la inmunodetección de una proteína de interés, se proceder a “borrar” la membrana (*stripping*) para volver a incubar la membrana con otro anticuerpo específico para otra proteína. Para ello se incuba la membrana durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación en 10 ml al 1X de la solución *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution 10X* de Merck. Durante ese tiempo se elimina el bloqueo y la inmunodetección, pero hay que tener en cuenta que al ser un proceso agresivo las bandas de proteínas transferidas también pueden verse afectadas si se repite demasiadas veces este paso. Después del borrado se realizan 3 lavados de 5 minutos con la solución de bloqueo y se vuelve a bloquear la membrana (ver sección 8.5.) para seguir con el paso de inmunodetección (ver sección 8.6.).

8.8. Densitometría

Finalmente, para comparar los niveles de una determinada proteína entre diferentes muestras, se mide la intensidad de las bandas obtenidas por Western blot mediante

análisis por densitometría, dado que dichas bandas determinan la cantidad de proteína presente en la muestra. Esto hace del Western blot una técnica semicuantitativa. Para ello se siguen los siguientes pasos:

1. En el caso de obtener las bandas en un film, se escanea y se guarda en formato TIFF.
2. Se abre la imagen obtenida con el escáner o con el sistema *ChemiDoc Imaging System* de BioRad en el programa de procesamiento de imagen digital "ImageJ".
3. Se transforma la imagen a 8-bit (escala de grises): Image>Type>8-bit.
4. Se invierte la escala de grises: Edit>Invert.
5. Se hace un rectángulo que determina el área de interés (ROI), en el que quepa cada una de las bandas individualmente. Se mide la intensidad de la señal (Analyse>Measure o sencillamente se pulsa la tecla M) y se va moviendo el rectángulo para ir englobando cada una de las bandas, sin cambiar las dimensiones del rectángulo.
6. Con el mismo rectángulo se mide la intensidad del fondo de la imagen para obtener un valor blanco o *background*. De este modo, este valor se restará a los valores obtenidos en cada una de las medidas de las bandas para eliminar el *background*.
7. Los valores obtenidos se normalizan por el valor del control de carga de cada muestra y se relativizan con respecto a la condición control.

9. Zimografía

La Lactato deshidrogenasa es una enzima implicada en la glucólisis y la vía gluconeogénica, encargada de catalizar la conversión recíproca entre piruvato y lactato en función de las necesidades energéticas de la célula. Se puede presentar en el citosol en cinco formas isoenzimáticas con diferente grado de expresión. Dependiendo del tejido celular se generan diferentes combinaciones tetraméricas entre las dos cadenas de LDHA y LDHB. Se denominan respectivamente LDH1 (4 tetromeros compuestos por 4 cadenas LDHB), LDH2 (4 tetrámeros compuestos por 3 cadenas LDHB y 1 cadena LDHA), LDH3 (4 tetrámeros compuestos por 2 cadenas LDHB y 2 cadenas LDHA), LDH4 (4 tetrámeros compuestos por 1 cadena LDHB y 3 cadenas LDHA) y LDH5 (4 tetrámeros compuestos por 4 cadenas LDHA). Siendo las LDH1 y LDH2, con más subunidades B, las que muestran una alta afinidad por el lactato y desempeñan un papel clave en la

catalización del lactato en piruvato, mientras que las LDH5 y LDH4, con más subunidades A, son todo lo contrario.

Por lo que, según los diferentes puntos isoeléctricos de las isoenzimas LDH, las 5 isoenzimas LDH pueden separarse mediante electroforesis y observarse mediante tinción las diferentes tasas de migración en el campo eléctrico (Figura 39).

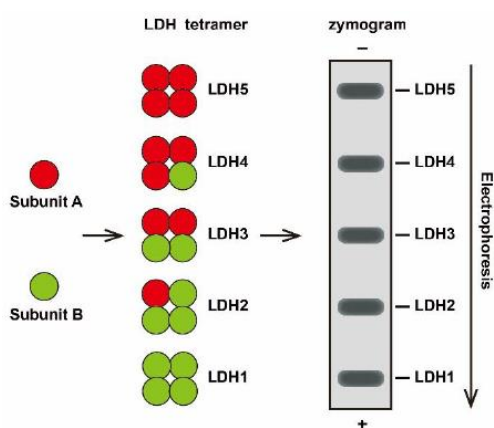


Figura 39. Estructura de los diferentes tetrámeros de las isoenzimas LDH y como se observan en el zimograma. Figura extraída de (Li P., Qiu N., Zhang L., Zhong G., Zeng F. (2019)) [357].

El protocolo seguido ha sido el siguiente:

1. En experimentos in vivo de ratones de 20 o 48 días, se sacrifican los animales por dislocación cervical y se aísla el tejido (ver sección 6.1.1.).
2. Se prepara la solución de PBS 1X con los inhibidores de proteasas de Calbiochem 1:100 y de fosfatasa II i III de Sigma 1:200 y, se añaden 20 ml de PBS por cada gramo de tejido. Se disgrega el tejido mediante una trituradora. (En experimentos in vitro se añaden de 100 µl de la solución PBS1X y se des-adhieren las células de la placa con la ayuda de una punta azul P1000).
3. La suspensión celular obtenida del paso 2 se homogeniza 50 veces con un émbolo de teflón mediante un homogenizador de vidrio en hielo.
4. Se transfiere el homogenado a un eppendorf y se centrifuga a 4.000 g durante 30 minutos a 8°C.
5. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo eppendorf y se preparan las muestras añadiendo 10 µl del tampón de carga 20% Azul de Bromofenol en 30 µl del sobrenadante de la muestra.
6. Se prepara un gel de agarosa al 0,5% en TBE 1X.
7. Se cargan las muestras al gel de agarosa y se deja correr a 100 V en TBE 1X pH=8,6 a 4°C durante 50 minutos.

8. Se incuba el gel durante 40 minutos en la solución de tinción a 37°C.

Tabla 14. Componentes de la solución tinción.

Solución de tinción rentable				
NAD+	Lactato de sodio (1M)	PMS (1mg/ml)	NBT (1mg/ml)	PBS 1X
15 mg	1,5 ml	0,4 ml	4 ml	10,75 ml

9. Se lava el gel 3 veces durante 3 minutos con agua destilada.

10. Se obtiene una imagen mediante el sistema *ChemiDoc Imaging System* de BioRad.

11. Mediante el software "*ImageJ*" se analiza la densitometría (ver sección 8.8.), excepto el punto 7) y se calcula el porcentaje de los valores obtenidos dividiendo cada valor por la suma total de los valores en cada condición.

10. Técnicas espectrofotométricas de absorción molecular

La espectrofotometría de absorción molecular es una técnica de medición óptica empleada para analizar las propiedades de la luz en una porción del espectro electromagnético en función de su longitud de onda (Figura 40). Para ello se proyecta un haz de luz a una determinada longitud de onda sobre una solución y, mediante un detector, se mide la cantidad de luz absorbida o transmitida por esta. De esta manera se pueden hacer análisis cuantitativos midiendo la cantidad de luz absorbida o transmitida por la solución, ya que es proporcional su concentración. Existen moléculas conocidas como cromóforos o cromógenos capaces de absorber energía al interactuar con una onda electromagnética. Estas moléculas al absorber energía experimentan saltos en sus electrones desde unas órbitas a otras más alejadas del núcleo (excitación) y, para regresar a su estado de reposo, desprenden la energía absorbida en forma de calor. Cuando una onda electromagnética visible incide sobre una solución que contiene estas moléculas, absorbe unas longitudes de onda y transmite y/o refleja otras que dan color a la solución. De manera que para determinar la absorbancia de esta solución se debe incidir con luz a la longitud de onda que es capaz de absorber más fuerte y esto dependerá del color visible que se presenta en esta.

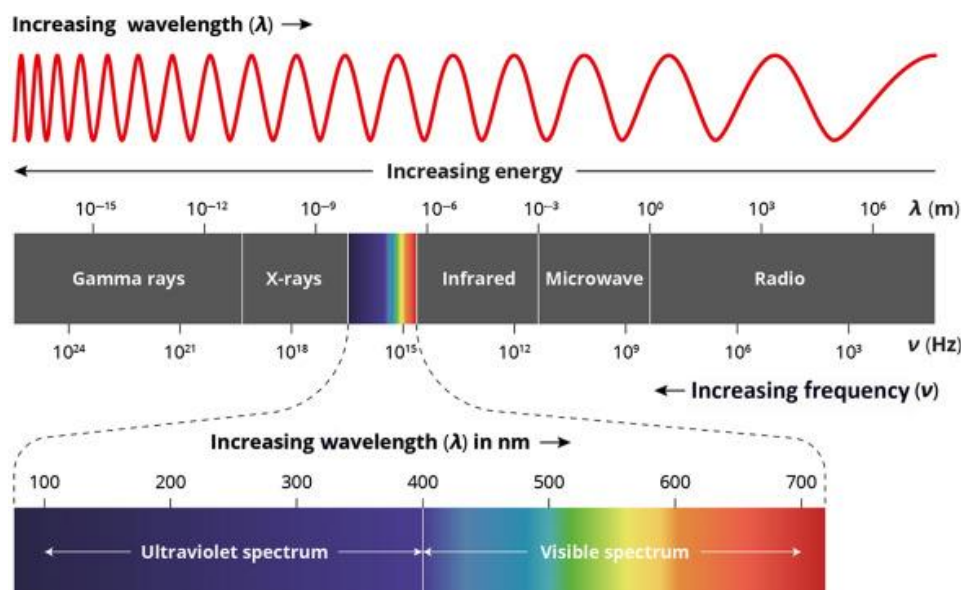


Figura 40. Diagrama del espectro electromagnético. Figura adaptada de (Kaur, G., Singh, H., & Singh, J. (2021)) [358].

Para este trabajo se han llevado a cabo ensayos colorimétricos y mediante un espectrofotómetro se han hecho análisis cuantitativos.

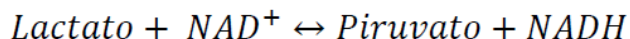
10.1. Medida de los niveles de lactato en el medio

La concentración de NAD⁺ disponible en la célula es muy baja, por lo que se agota muy rápido y es necesario regenerarlo a partir de NADH. Normalmente se genera NAD⁺ en la Cadena de Transporte de Electrones, pero también es posible generar NAD⁺ en el citoplasma mediante la LDH. A partir del piruvato acumulado se genera NAD⁺, disponible nuevamente para la Glucólisis, y Lactato. De esta manera la célula obtiene ATP y puede cubrir sus necesidades energéticas más importantes. Dado que esta ruta metabólica es la principal fuente de lactato de la célula, la liberación de lactato al medio es considerada una buena medida de la actividad glucolítica.

Mediante el compuesto químico hidracina el piruvato es convertido en piruvato hidrazono, el cual no puede ser procesado por la LDH. Y, en presencia de hidracina y NAD⁺ en exceso, la reacción catalizada por la enzima LDH se da únicamente en el sentido oxidativo. De manera que se puede medir la concentración de lactato en la muestra ya

que esta es proporcional al incremento en los niveles de NADH, cuantificados por absorbancia.

Reacción de oxidación del lactato por la enzima LDH en presencia de NAD⁺:



El protocolo seguido ha sido el siguiente:

1. Se extraen 0,5 ml 0,5 ml de medio de un cultivo celular.
2. Se centrifugan a 10000g durante 10 minutos a 4 °C mediante los filtros *Amicon Ultra-0.5 ml Centrifugal Filters 10K* de Merck para eliminar posibles proteínas presentes en el medio.
3. De cada condición se transfieren 50 µl de medio filtrado a 5 pocillos de una placa de 96.
4. Se preparan las mezclas de reacción teniendo en cuenta que a cada pocillo se le añadirán 200 µl de la misma.

Tabla 15. Mezclas de reacción para medir los niveles de lactato en el medio.

Mezcla de reacción		Mezcla para el blanco	
Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración
Glicina	320 mM	Glicina	320 mM
Hidracina	320 mM	Hidracina	320 mM
NAD ⁺	2,4 mM	NAD ⁺	2,4 mM
LDH	2 U/ml	H ₂ O Mili-Q	-
H ₂ O Mili-Q	-		

5. Se añaden 200 µl de la mezcla de reacción o de la mezcla para el blanco a los pocillos correspondientes y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. 3 pocillos servirán para cuantificar la cantidad de lactato y los 2 pocillos restantes se utilizarán como blanco, sin enzima.
6. Se lleva a cabo la lectura de la absorbancia a 340 nm utilizando un lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN).
7. Se realiza la media de los 3 pocillos con enzima para cada condición y se le resta la media de sus respectivos blancos.

8. Se normalizan los valores obtenidos por la proteína total de cada pocillo, mediante el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (ver sección 10.3.) añadiendo 100 µl de CellLytic™ M de Sigma por pocillo de placa de 24.

10.2. Medida de los niveles de hierro

Mediante un ensayo colorimétrico basado en ferrozina se ha medido el contenido de hierro en células cultivadas. Este ensayo permite cuantificar tanto hierro ferroso como hierro férrico en cantidades que varían entre 0,2 y 30 nmol. La ferrozina forma un complejo con el hierro ferroso (Fe^{2+} -ferrozina) que absorbe fuertemente la luz a 550 nm y es proporcional a la concentración de hierro. El protocolo seguido ha sido el siguiente:

1. Se lavan las células 2 veces en PBS 1x (0.5 ml por pocillo de placa de 24) sobre una superficie horizontal en hielo.
2. Se añaden de 30 µl de PBS1X y se des-adhieren las células de la placa con la ayuda de una punta azul P1000.
3. Se recogen las células en un eppendorf de 1,5 ml y se pasan 200 µl de esta suspensión a un nuevo eppendorf.
4. Se añaden 44 µl de HCL 11.6M y se incuban los eppendorfs a 95°C 20 minutos. Se separan 10 µl para cuantificar proteína en 50 µl de LB.
5. Se centrifuga a 12000g 10 minutos y se pasa el sobrenadante a un nuevo eppendorf.
6. En el sobrenadante se añaden 117 µl de ascorbate 3M y se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos.
7. Seguidamente, se añaden 127,23 µl de ammonium acetate 10.5M y 30.71 µl de ferrozine 80 mM.
8. Se mide la absorbancia dentro de los 30 minutos después de hacer el experimento a 570 nm utilizando un lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN). Pasado ese tiempo desaparece la reacción.
9. Se normalizan los valores obtenidos por la proteína total de cada pocillo, mediante el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (ver sección 10.3.).

10.3. Cuantificación de proteína

Durante este trabajo, se han realizado técnicas donde se analizaban valores que provenían de un número indeterminado de células cultivadas en el pocillo de una placa. Por lo que es necesario normalizar los resultados obtenidos según la cantidad de células presente en el pocillo. Y para ello se lleva a cabo la cuantificación de proteínas mediante el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* de Thermo Fisher Scientific de la siguiente manera:

1. En el caso de que haya que lisar la muestra se añade el tampón de lisis CellLytic M de Sigma (100 µl por pocillo de placa de 24) y se agita durante 10 minutos a 150 rpm.
2. Se prepara la recta patrón de albúmina de suero bovino, partiendo del stock 2 mg/ml y diluyéndolo 1:2 en agua milliQ hasta 0,0625 mg/ml, y se añaden 5 µl de cada concentración de la recta patrón por pocillo en una placa de 96 pocillos (por triplicado)
3. Se añaden 5 µl de lisado de la muestra por pocillo (por triplicado).
4. Se prepara la solución de reacción (volumen X reactivo A, volumen X/50 de reactivo B) y se añaden 150 µl por pocillo.
5. Se incuba 30 minutos en una estufa a 37°C. y, pasado ese tiempo, se mide la absorbancia a A562 utilizando un lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN).

11. Técnicas espectrofotométricas de fluorescencia

La espectrofotometría de fluorescencia es una técnica que mide la emisión de luz fluorescente que ocurre cuando una muestra es excitada con luz de una longitud de onda específica (Figura 41). La fluorescencia es un tipo de luminiscencia que se da en moléculas capaces de absorber radiaciones electromagnéticas de una determinada longitud de onda, y emitir parte de esa energía como radiación de una longitud de onda diferente a la absorbida.

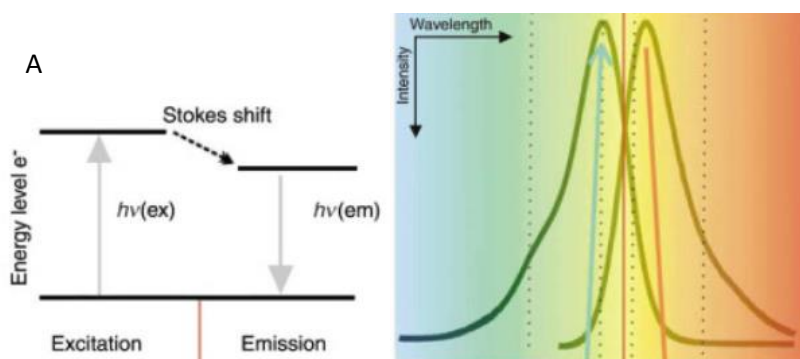


Figura 41. Principios de la Fluorescencia. (A) Luz emitida después de la excitación del estado electrónico en una sustancia fluorescente, (B) Espectros de absorción y emisión de la sustancia fluorescente. Figura adaptada de (Szabadkai, G., & Rizzuto, R. (2004)) [359].

11.1. Medida de los niveles de peroxidación lipídica

Los lípidos se caracterizan por la presencia de uno o más elementos estructurales que contienen un grupo metileno (CH_2) entre enlaces dobles [360]. Los enlaces carbono-hidrógeno en estas unidades de metileno tienen energías de disociación de enlace más bajas, lo que hace que estos átomos de hidrógeno se extraigan más fácilmente en reacciones radicalarias [361]. La peroxidación lipídica es un proceso en el que las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno transforman lípidos (colesterol, ácidos grasos poliinsaturados, mediante un proceso que implica la extracción de hidrógeno de un carbono y la inserción de una molécula de oxígeno, en hidroperóxidos lipídicos (LOOH) y sus productos de descomposición como aldehídos y cetonas (malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal como productos secundarios predominantes) [362].

Aunque las ROS se producen continuamente durante el metabolismo normal, los sistemas antioxidantes integrados en la célula previenen la peroxidación lipídica. En ausencia de mecanismos de defensa adecuados se provoca un desequilibrio intracelular prooxidante/antioxidante que conduce al estrés oxidativo, lo que resulta en peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica puede dañar directamente la estructura de la membrana provocando radicales libres en los lípidos de la membrana que pueden alterar el ensamblaje de la membrana, provocando cambios en la fluidez y la permeabilidad, alteraciones del transporte de iones e inhibición de los procesos metabólicos [362].

La MDA es el aldehído más abundante resultante de la peroxidación lipídica y ha sido ampliamente utilizado en la investigación biomédica como marcador de peroxidación lipídica debido a su fácil reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA) (Figura 42) [363].

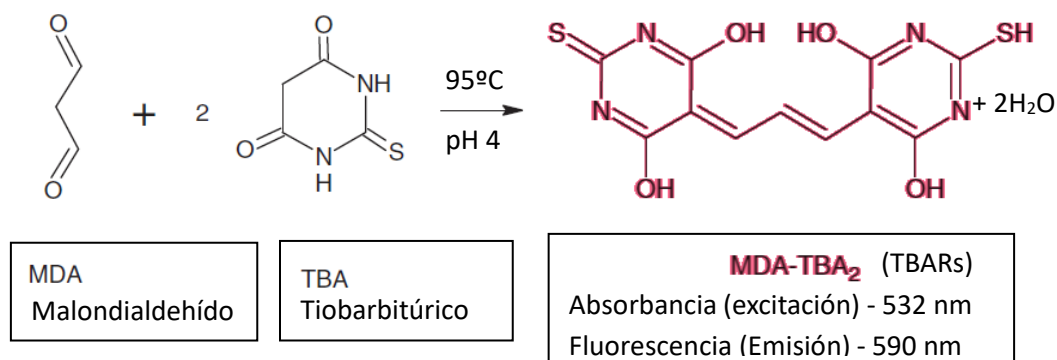


Figura 42. Reacción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). La reacción conduce a la formación de MDA-TBA₂, un conjugado de color rosa que se absorbe en el espectro visible a 532 nm en el espectrofotómetro UV. Figura adaptada de (Aguilar Diaz De Leon, J., & Borges, C. R. (2020)) [364].

Para determinar los niveles de peroxidación lipídica en las células se ha seguido el siguiente protocolo:

1. Se prepara el reactivo TBARS (188 mg TBA + 1,25 ml HCl 37% + 7,5 ml TCA 100% + 41,25 ml H₂O) y se calienta a 50°C protegiendo de la luz y en agitación hasta que se disuelva completamente.
2. Partiendo de células lisadas en PBS 1X con inhibidores de proteasas y fosfatasa, se transfieren 150 µl de cada muestra a un nuevo eppendorf en hielo. Guardando 30 µl para cuantificar proteína.
3. Se añaden 240 µl del reactivo TBARS y se vortea vigorosamente durante 3-4 segundos.
4. Se agujerea el tapón con una aguja y se incuban las muestras en un baño seco dentro de una campana de extracción de gases a 95-100°C durante 20 minutos. A mitad del tiempo de incubación se agitan los tubos manualmente.
5. Culminado el tiempo de incubación se enfrían las muestras rápidamente en un baño de agua-hielo.
6. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo eppendorf y se añaden 180 µl de 2-butanol frío.

7. Se agita con el vórtex y se centrifuga a 3000 rpm 10 minutos a 4°C.
8. Se transfieren 75 µl de la fase orgánica (fase superior) a una placa de 96 pocillos y se lee la fluorescencia utilizando un lector de placas Infinite M200 PRO (TECAN). Excitación 530 nm y emisión a 590 nm.
9. Se normalizan los valores obtenidos por la proteína total de cada pocillo, mediante el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (ver sección 10.3).

11.2. Medida de los niveles de grupo hemo

El hemo intracelular sirve como grupo prostético en numerosas enzimas y proteínas que transportan, almacenan o utilizan oxígeno, como los citocromos mitocondriales y el citocromo P450. Además, el hemo desempeña funciones esenciales en la eritropoyesis, la neurogénesis, el crecimiento y la diferenciación celular. En este trabajo se ha medido la concentración de grupos hemo presentes en la célula mediante una reducción ácida. El ácido oxálico es un ácido orgánico que acidifica el medio y genera una condición reductora que permite la conversión del grupo hemo de la hemoglobina a su derivado fluorescente de porfirina mediante la eliminación del catión de hierro (Figura 43). Las porfirinas tienen un color intenso que se absorbe fuertemente en la región visible del espectro electromagnético, un ejemplo de porfirina es el hemo, cofactor de la proteína hemoglobina, que da pigmento a los glóbulos rojos [365].

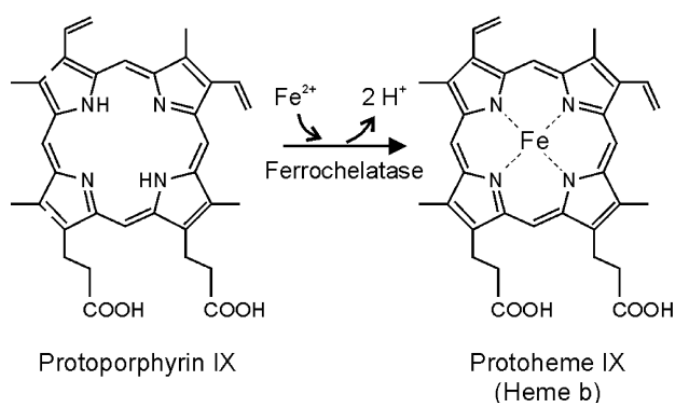


Figura 43. Reacción de la formación de hemo. La ferroquelatasa cataliza la formación de hemo (protohema IX) mediante inserción de un ion ferroso en protoporfirina IX. Imagen extraída de (Lecero, D., *et al.* (2003)) [365].

Para determinar los niveles de hemo intracelular se ha seguido el siguiente protocolo:

1. Previamente se prepara justo antes del experimento el ácido oxálico 2 M, calentando la solución para conseguir disolverla (tarda un rato).

2. Partiendo de neuronas corticales de rata cultivadas en placas de 24 pocillos, se hacen 2 lavados con PBS 1X en hielo.
3. Se añaden 100 μ l de PBS 1X y se des-adhieren las células de la placa con la ayuda de una punta azul P1000. Se separan 20 μ l para cuantificar por proteína total.
4. Se centrifuga a 2000g durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante.
5. Se resuspende el pellet en 160 μ l de ácido oxálico 20 mM.
6. Se añaden 160 μ l de ácido oxálico 2 M, se resupende y se separan 80 μ l (muestra correspondiente sin hervir para corregir la fluorescencia de fondo). El resto se calienta a 98-100°C durante 30 minutos. (los 80 μ l se mantienen a temperatura ambiente en oscuridad durante los 30 minutos).
7. Se centrifuga a 16000g 2 minutos y de la suspensión se añaden 75 μ l por pocillo en una placa p96 negra (Falcon® 96-well Black Flat Bottom TC-treated Microplate de corning).
8. Se mide la fluorescencia utilizando un lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN). Excitación 400 nm y emisión a 620 nm. Para cada muestra hervida, se resta la fluorescencia de la muestra sin hervir correspondiente para corregir la fluorescencia de fondo.
9. Se normalizan los valores obtenidos por la proteína total de cada pocillo, mediante el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (ver sección 10.3.).

Para una curva estándar: se prepara hemina diluida en DMSO a diferentes concentraciones (1000 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0 μ M).

11.3. Medición de la Tasa de consumo de oxígeno

Una manera de analizar la actividad metabólica celular es midiendo la tasa de consumo de oxígeno (OCR, por sus siglas en inglés), ya que es un indicador de la función mitocondrial. Para ello durante este trabajo se ha utilizado el kit *MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay* de Agilent, el cual mediante un sustrato fluorescente que en presencia de oxígeno no emite fluorescencia, mide en tiempo real el consumo de oxígeno extracelular de células cultivadas. El protocolo seguido se describe a continuación:

1. Se infectan las neuronas en una placa de 96 pocillos con los virus que codifican para la proteína de interés (ver sección 17.4.).
2. Se estimulan sinápticamente las neuronas (ver sección 2.6.) y, se tratan o no con el quelante del hierro 2,2'-Bipyridyl 100 μ M (BPY) de sigma.
3. Se resuspende el sustrato del kit en 1 ml de NBA (puede conservarse a -20°C hasta un mes).
4. Se elimina el medio de los pocillos donde están las células y se reemplaza por 90 μ l de medio NBA, excepto en los que se utilicen como controles, que se añaden 100 μ l.
5. Se añade 10 μ l de sustrato en cada pocillo, excepto en los controles.
6. Se sella el pocillo añadiendo dos gotas de aceite mineral atemperado a 37°C en la superficie del mismo para bloquear el intercambio de oxígeno del medio con el aire y, inmediatamente se introduce la placa en el lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN). De esta manera, a medida que las células vayan consumiendo el oxígeno del medio, éste va dejando de inhibir al sustrato fluorescente, lo que hace que la señal del reactivo MitoXpress Xtra aumente y el lector de placas mida esta fluorescencia a tiempo real, obteniendo un análisis cinético de la tasa de consumo de oxígeno.
7. Se mide la fluorescencia (380 nm excitación y 650 nm emisión) cada minuto durante tres horas, a 37°C.
8. A partir de los valores obtenidos en la lectura de fluorescencia, se genera una gráfica fluorescencia-tiempo y, para determinar el valor de la tasa de consumo de oxígeno, se mide la pendiente de la parte lineal de la gráfica.
9. Para normalizar los valores obtenidos por la proteína total de cada pocillo, se añaden 50 μ l por pocillo del tampón de lisis *CellLytic M* de sigma (ver sección 10.3.).

Para medir la respiración máxima se añade a las células CCCP 10 μ M justo después el punto 5.

12. Técnicas de luminiscencia

La luminiscencia es la emisión de luz por parte de una sustancia como resultado de una reacción química (quimioluminiscencia) o enzimática (bioluminiscencia). Mediante un iluminómetro se mide la cantidad de luz producida por una reacción química o

enzimática. Para ello la luz resultante se detecta mediante un tubo fotomultiplicador en el que los fotones se convierten en electrones y la aceleración de estos bajo un campo de alto voltaje se traduce en una señal que se expresa en unidades relativas de luz (RLU).

12.1. Medida de los niveles de ATP

La cuantificación de los niveles de ATP intracelular, para estudiar y determinar el estado de funcionalidad de las mitocondrias, se ha realizado siguiendo el protocolo del kit comercial utilizado ATPlite Luminescence Assay System de PerkinElmer. Este kit se basa en la generación de luz causada por la reacción de oxidación catalizada por la luciferasa, la cual gasta ATP para oxidar luciferina. La señal de luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP, por lo que se puede medir la cantidad de ATP intracelular a partir de la medida de luz emitida mediante un lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN). Después de la lectura de luminiscencia, los valores obtenidos se normalizan por la cantidad de proteína total presente en el lisado celular mediante el kit BSA Protein Assay (23225) (ver sección 10.3).

12.2. Medida de los niveles de NAD⁺/NADH

Durante el metabolismo mitocondrial la activación de las deshidrogenasas del ciclo TCA y PDH aumenta la generación de NADH, alterando el equilibrio a proporciones más altas de [NADH:NAD⁺].

Cuantificación NAD⁺/NADH

La cuantificación de los niveles de dinucleótidos de nicotinamida adenina oxidados y reducidos (NAD⁺ y NADH, respectivamente) se midieron siguiendo el protocolo del kit comercial utilizado NAD⁺/NADH Glo Assay de Promega. Las moléculas de NAD⁺ y NADH son importantes para los principales procesos celulares, incluidos el metabolismo, la transducción de señales y la epigenética. Este kit mide la cantidad de NAD⁺ y NADH en una muestra a partir de la señal luminosa producida por la reducción de un sustrato de la proluciferina reductasa a luciferina. Para ello, primero se convierten las moléculas de NAD⁺ a NADH mediante la enzima cíclica de NAD y, a partir de este NADH generado, una enzima reductasa reduce el sustrato de la proluciferina a luciferina. Finalmente, esta

luciferina es detectada mediante la luciferasa recombinante Ultra-Glo™ (rLuciferasa). Se mide la luz emitida mediante un lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN). Para medir los niveles de NAD⁺ y NADH individualmente, antes de proceder a añadir las enzimas a la muestra, se elimina el NAD⁺ calentando a 60°C 15 minutos, o bien, el NADH añadiendo HCl 0,4M y calentando a 60°C 15 minutos.

Después de la lectura de luminiscencia, los valores obtenidos se normalizan por la cantidad de proteína total presente en el lisado celular mediante el kit BSA Protein Assay (23225) (ver sección 10.3.).

13. Separación celular por citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite estudiar numerosos parámetros celulares y clasificar las células según sus características morfológicas. Para ello, mediante un láser focalizado que incide sobre un flujo continuo de células en suspensión y alineadas, un dispositivo de detección recoge la luz transmitida y dispersada por cada una de estas células, permitiendo hacer inferencias en cuanto a su tamaño y complejidad. Para este trabajo se ha utilizado esta técnica con el fin de determinar y separar aquellas células que se hayan transfectado con éxito y hayan integrado el plásmido que codifica la proteína a estudiar (un *shRNA* dirigido al gen que transcribe la proteína transportadora de hierro mitocondrial mitoferrin-1). Para poder separar las células transfectadas de las no transfectadas es necesario un parámetro que las permita diferenciar. En este trabajo se ha utilizado un plásmido que codifica para la proteína fluorescente verde “GFP” como marcaje para identificar mediante fluorescencia verde las células transfectadas.

Para llevar a cabo la separación por citometría de flujo se ha seguido el siguiente protocolo:

1. Se siembran X células por pocillo en una placa de 6 pocillos.
2. Al día siguiente estarán al 80% de confluencia, por lo que se procede a cotransfectar el plásmido de interés con el de GFP (ver sección 4.8.), excepto un pocillo que se utiliza como control.

3. 48 horas después, se realiza un lavado con 1 ml PBS1X por pocillo y se añaden 0,5 ml de tripsina a cada pocillo.
4. Se añaden 2 ml de DMEM 4,5g/l glucosa suplementado para inactivar la tripsina y se disgregan los agregados celulares por pipeteo.
5. Se pasa el contenido a un tubo Falcon de 15 ml y centrifuga durante 5 minutos a 1000rpm.
6. Se elimina el líquido y se resuspende en 350 µl SGG (sin calcio, magnesio ni rojo de fenol) y se deja en un eppendorf en hielo.
7. En el citómetro de flujo del servicio de Citometría de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona se realiza la separación de células, utilizando el pocillo de células no transfectadas como blanco para determinar el nivel basal de fluorescencia.
8. Las células que presentan fluorescencia verde se separan en un Falcon de 15 ml con 3 ml de DMEM 4,5 g/l glucosa suplementado.
9. En el laboratorio se centrifugan los tubos durante 5 minutos a 1000 rpm y se resuspende el pellet en DMEM 4,5 g/l glucosa suplementado. Para sembrar en placas de 96 pocillos se siembran 33.0000 células por pocillo en un volumen final de 150 µl. Para sembrar en placas de 24 pocillos se siembran 50.0000 células por pocillo en un volumen final de 1 ml. Para sembrar en placas de 6 pocillos se siembran 150.0000 células por pocillo en un volumen final de 2 ml.
10. Se deja incubar la placa en la incubadora a 37°C y 5% CO₂ hasta el día siguiente, cuando se va a realizar el experimento que proceda (extracción de RNA Y extracción de proteína).

14. Microscopía de campo claro y de contraste de fases

La microscopia de campo claro es el método de microscopía óptica más utilizado para observar muestras altamente contrastadas con tintes o pigmentos naturales que no son visibles para el ojo humano. Mediante una fuente de iluminación (luz blanca) y una lente que actúa como condensador, ilumina la muestra concentrando los rayos de luz dispersos en un punto y, mediante otra lente en el objetivo, recoge los rayos de luz aumentando la imagen para proyectarla en un ocular o una cámara. No obstante, en el

caso de querer observar muestras sin teñir, un microscopio convencional de campo claro no resulta demasiado útil. Las estructuras internas de las células tienen diferentes índices de refracción, al igual que el medio que les rodea, por lo que, la luz que pasa por regiones de mayor índice de refracción experimenta una deflexión y queda fuera de fase con respecto al haz principal de ondas de luz que pasaron la muestra, ya que la onda al refractarse pierde velocidad. Por lo tanto, en el caso de querer evaluar células vivas se usan microscopios de contraste de fases, en los que, por medio de un condensador especial, se logran separar los rayos luminosos que son difractados por el objeto de los que no lo hacen. Y, mediante una serie de anillos ópticos del objetivo y del condensador, se anula la amplitud de la porción fuera de fase inicial del haz de luz y se produce un contraste útil sobre la imagen que se percibe en distintos tonos de gris (las partes oscuras de la imagen corresponden a porciones densas y las partes claras a porciones menos densas).

14.1. Seguimiento, viabilidad de cultivos celulares

Para garantizar que se trabaja con células cultivadas en condiciones óptimas, es necesario hacer un seguimiento de los cultivos celulares. Para este trabajo este hecho es importante dado que se trabaja con cultivos primarios de neuronas, las cuales son especialmente sensible frente a variaciones en su preparación y en sus medios de mantenimiento. Por lo tanto, después de cultivar o manipular células, y antes de realizar cualquier experimento, estas se observan bajo el microscopio de contraste. Y, en el caso de observar que las células no se encuentran en las condiciones adecuadas, el cultivo se descarta.

14.2. Contaje de cultivos celulares

En el caso de las líneas celulares, al realizar las siembras en las placas con pocillos para llevar a cabo los experimentos, es necesario realizar un contaje de las mismas para sembrar siempre el mismo número de células. Para ello se ha utilizado la cámara de Neubauer de la siguiente manera:

1. Después de tripsinizar las células (ver sección 3.3.), se toman 10 μl de la suspensión celular, y se cargan en una cámara de Neubauer. En el caso de necesitar calcular la

viabilidad se mezclan los 10 μ l de la suspensión celular con 10 μ l del colorante azul de tripano, el cual tiñe únicamente las células muertas cuya membrana al estar comprometida, permite que el colorante la atraviese.

2. Se cuentan las células presentes en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer y se calcula la media.
3. Se multiplica el valor obtenido por 10.000 para obtener el número de células por mililitro que hay en la suspensión celular y, en el caso de haber añadido azul de tripano, se multiplica luego por 2, dado que se ha diluido 1:1 con el colorante.

15. Microscopía de fluorescencia y confocal

La microscopía de fluorescencia es una técnica de imagen utilizada en biología molecular en la que, mediante un adaptador de fluorescencia (fuentes de luz de mercurio, láseres o luces LED) se emiten rayos de luz de una determinada longitud de onda que inciden sobre un determinado fluorocromo (sondas fluorescentes, colorantes “*dyes*” o proteínas unidas a anticuerpos). Estos fluorocromos se excitan absorbiendo la luz de un determinado espectro, al excitarse tienen la propiedad de pasar a un nivel superior de energía, y, a medida que las moléculas excitadas regresan a su estado normal, liberan el exceso de energía en forma de fotones de mayor longitud de onda que pueden ser visualizados mediante distintos filtros. Esta técnica permite investigar la localización celular de una proteína e incluso, llevar a cabo estudios de co-localización y de interacción usando colorantes que se unen de forma reversible.

Los microscopios de fluorescencia utilizados a lo largo de este trabajo son un Olympus BX61/BX62 acoplado a una cámara Olympus DP70 y un microscopio de fluorescencia invertido Leica DM IRB acoplado a una cámara Leica DFC550. No obstante, para una observación en gran detalle la imagen se ve deteriorada a causa de la superposición de los elementos que están tanto por debajo como por encima del plano enfocado, por lo que se pierde la información tridimensional de la muestra. Por lo tanto, si se requiere analizar de manera detallada las estructuras internas de la célula, es necesario el uso de microscopía confocal. El orificio de los microscopios confocales bloquea la captación de la mayoría de luz no enfocada y permite la detección de un único plano, permitiendo generar secciones ópticas enfocadas y nítidas en el plano z de entre 0,16 y 1,5 μ m.

Además, la integración de las diferentes secciones obtenidas permite generar una representación en tres dimensiones de la muestra. El microscopio confocal utilizado en este trabajo es un Microscopio confocal con superresolución Zeiss LSM 880, ubicado en el servicio de Microscopía Óptica Avanzada de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona.

15.1. Fijación de muestras con paraformaldehído

En células cultivadas que serán observadas por microscopia se debe realizar la fijación con paraformaldehído (PFA) 3% para conservar la estructura celular con sus elementos intracelulares y evita la autólisis. Para ello se siguen los siguientes pasos en la campana de extracción de gases:

1. Se prepara la solución fijadora PFA3% sacarosa a partir del PFA 16% (3% PFA, 4% sucrose, PBS 1X).
2. Se elimina el medio de los pocillos y se añaden 250 μ l por de solución fijadora.
3. Se incuba durante 20 minutos protegido de la luz.
4. Se elimina la solución fijadora depositándola en un bidón de residuos y se realizan 3 lavados con PBS 1X.
5. Se depositan 4 μ l de *VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI* de Vector Laboratories sobre un portaobjetos. El DAPI, además de permitir visualizar los núcleos de las células, permite determinar la viabilidad de las mismas (ver sección 14.2.).
6. Con la ayuda de unas pinzas se deposita el cubreobjetos encima de las gotas. Y se conserva a 4°C y protegido de la luz.

15.2. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que utiliza anticuerpos conjugados a fluorocromos para la detección de una determinada proteína o molécula. Mediante el método directo el anticuerpo que reconoce a la proteína está unido directamente a la molécula fluorescente, mientras que, mediante el método indirecto, el anticuerpo es reconocido por un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo. Para este trabajo, se ha utilizado un método indirecto, por lo que. Además, se han utilizado

anticuerpos secundarios conjugados a biotina y posteriormente estreptavidina conjugada a un fluorocromo, por lo que se produce un efecto de amplificación que aumenta la sensibilidad de la técnica. El protocolo seguido se detalla a continuación: (En el caso de no utilizar estreptavidina conjugada, se eliminan los puntos 8 y 9).

1. Se fijan de las células (ver sección 15.1.).
2. Para permeabilizar las membranas celulares se incuban las células durante 5 minutos con PBS 1X + Nonidet P40 0,5%.
3. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X en agitación.
4. Se bloquea el cubre en 250 µl de solución de bloqueo (PBS 1X + BSA 3%) en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. En una cámara húmeda se deja el cubre boca abajo en contacto con 10 µl de la solución de anticuerpo primario (preparado en solución de bloqueo + azida 1:500) a 4°C hasta el día siguiente.
6. Se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5 minutos en agitación y se añaden 250 µl por pocillo de anticuerpo secundario conjugado a biotina (preparado en solución de bloqueo).
7. Se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente y se llevan a cabo 3 lavados con PBS 1X de 5 minutos en agitación.
8. Se añade 250 µl por pocillo de estreptavidina conjugada al fluorocromo de interés (preparado en solución de bloqueo) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
9. Se llevan a cabo 3 lavados con PBS 1X de 5 minutos en agitación.
10. Se montan los cubreobjetos en un portaobjetos (ver sección 14.2.).

Para el montaje de las imágenes representativas, se sigue el proceso descrito a continuación:

1. Se cargan las imágenes en el software ImageJ y se realiza la siguiente acción:
2. Image>Color>Merge Channels: Para fusionar los canales en un solo stack.
3. Image>Color>Split Channels: para separar los canales de fluorescencia en un stack de imágenes por separado.
4. Image>Stacks>Z Project: para transformar todas las imágenes del stack en una única imagen que recopile la información.

15.3. Análisis de viabilidad

En este trabajo se han hecho estudios de viabilidad o mortalidad celular para evaluar el potencial de toxicidad de algunos fármacos en el cultivo celular, o bien, para analizar el efecto protector de otros fármacos en cultivos celulares que no se encuentran bajo condiciones óptimas. Para ello se utiliza el compuesto químico 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de Roche el cual, puede unirse al surco menor del DNA de doble cadena, preferiblemente en regiones enriquecidas con adenina y timina y, emite fluorescencia azul al excitarse con un láser UV.

Para analizar la viabilidad en un cultivo celular se han seguido los siguientes pasos:

1. Se fijan las células (ver sección 15.1.).
2. Después de los lavados con PBS 1X se marcan los núcleos celulares con DAPI (1 µg/mL) mediante una incubación de 5 minutos en agitación, protegiendo de la luz. En el caso de que se utilicen preparaciones en cubres estas se montaran con el medio de montaje que ya lleva incorporado el DAPI (ver sección 14.2.).
3. Se hacen otros 3 lavados de 5 minutos en agitación con PBS 1X.
4. Se toman imágenes bajo el objetivo 10X en el microscopio de fluorescencia invertido Leica DM IRB acoplado a una cámara Leica DFC550 o el microscopio de fluorescencia Olympus BX61 acoplado a una cámara Olympus DP70.
5. Mediante el software ImageJ se cuenta el porcentaje de nucleos picnóticos, producto de condensaciones irreversibles de la cromatina, aparecidas en las células como consecuencia de procesos de necrosis o apoptosis.

15.4. Potencial de membrana mitocondrial

La medida del potencial de membrana mitocondrial permite determinar el estado de funcionalidad mitocondrial, ya que indica la capacidad de las mitocondrias de producir energía. La fosforilación oxidativa la cadena de transporte de electrones genera un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna que se utiliza para la síntesis de ATP. En el caso de que las mitocondrias no funcionen correctamente este gradiente de protones se ve disminuido y, por tanto, el potencial de membrana mitocondrial.

En este trabajo se ha determinado el potencial de membrana mitocondrial mediante la sonda roja fluorescente *tetramethylrhodamine methylester* (TMRM) de Sigma, la cual es capaz de penetrar en las mitocondrias en función de su potencial de membrana (a mayor potencial de membrana mayor señal de fluorescencia). El protocolo a seguir ha sido el siguiente:

1. Se lavan las células con medio SGG⁻ (sin calcio, magnesio ni rojo de fenol) suplementado con glucosa 30 mM (0,5 ml por pocillo de placa de 24).
2. Se incuban las células durante 30 minutos a 37°C en TMRM a una concentración de 6 nM en medio SGG⁻ suplementado con glucosa 30 mM (1 ml por pocillo de placa de 24).
3. Pasada la incubación, se lavan las células con medio SGG⁻ suplementado con glucosa 30 mM (0,5 ml por pocillo de placa de 24) y se dejan en 1 ml de este medio.
4. Se toman imágenes con el microscopio de fluorescencia Leica DM IRB acoplado a una cámara Leica DFC550. Se toman imágenes antes y después de aplicar 10 μM CCCP por pocillo. El CCCP despolariza totalmente las mitocondrias y la fluorescencia captada consiste en el marcaje inespecífico de la sonda.
5. Mediante el software ImageJ se mide la fluorescencia.
 - Se traza un círculo ROI (región de interés) y se marcan las células con la tecla “t” para guardar las coordenadas de cada célula.
 - Mediante la tecla “m” se mide el valor de la intensidad de fluorescencia de las células marcadas en cada imagen (sin aplicar CCCP y aplicando CCCP). En cada imagen, se toma la medida en un lugar donde no haya células, para obtener el *background*.
6. Se le resta a cada célula el valor obtenido tras aplicar CCCP y el *background* de cada imagen. De esta manera, se elimina el marcaje inespecífico de la sonda.
7. Finalmente, se relativizan los valores obtenidos en cada una de las condiciones analizadas con la condición control.

15.5. Medidas de Ca²⁺

En las neuronas los iones de calcio (Ca²⁺) actúan como segundo mensajero en vías de transducción de señales que estimulan la liberación de neurotransmisores, la

neurogénesis y la activación de factores de transcripción que regulan dichos procesos. Las mitocondrias y el retículo endoplásmico son los principales orgánulos en los que se almacena el calcio intracelular para ser liberado en respuesta a eventos celulares específicos. No obstante, el calcio extracelular también es importante para mantener la diferencia de potencial a través de las membranas celulares excitables.

En este trabajo se ha medido el Ca^{2+} mitocondrial para determinar cómo varía en distintas condiciones la cantidad de Ca^{2+} . Para ello se ha utilizado la sonda fluorescente sensible a los cambios de Ca^{2+} Fluo-4 de Life Technologies.

Para estos experimentos, las neuronas han sido sembradas en placas de 35 mm especiales para microscopía de MatTek Corporation. Mediante la toma continua de imágenes por microscopía confocal durante un cierto periodo de tiempo y, tras la aplicación de unos ionóforos concretos, se monitoriza *in vivo* la dinámica del Ca^{2+} en distintas condiciones.

Ca^{2+} mitocondrial

Para medir la cantidad de Ca^{2+} mitocondrial se ha utilizado la sonda Fluo-4. Presenta niveles máximos de excitación/emisión de $\sim 465/540$ nm. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Se lavan los pocillos 3 veces con solución HBSS⁺ (con glucosa y HEPES).
2. Se añade HBSS⁺ con Fluo-4 AM a una concentración de 2 μM (stock 1 mM en 20% pluronic en DMSO) y se deja incubar a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 45 minutos. Se añaden 0,5 ml por pocillo de placa de 24.
3. Se lavan los pocillos 3 veces con solución HBSS⁺.
4. Se retira la sonda lavando 3 veces con solución HBSS⁺.
5. Se mantienen las células en medio HBSS⁺ (1,5 ml por pocillo de placa de 24) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Se procede a la toma de imágenes en el microscopio confocal Zeiss LSM 880. Se excita con un láser de 488 nm y se observa con un filtro de 516nm.
-Se añade CCCP 10 μM para desacoplar las mitocondrias y así observar el Ca^{2+} liberado por estas.

-Se añade Ionomicina 10 μM para inducir la entrada de calcio a las células a través de la membrana celular. De esta manera se calibra la sonda, ya que es un control positivo.

Para cuantificar los niveles de calcio se determinan los valores de intensidad de fluorescencia durante el tiempo mediante el software *ImageJ*. Se determina el ROI, y a continuación se selecciona Image>Stacks> Plot Z-axis Profile.

15.6. Mediciones del transporte de glucosa celular

Para medir la captación de glucosa en neuronas cultivadas, se ha utilizado el análogo fluorescente de la glucosa 2- [N-(7-nitrobenze-2-oxa-1, 3 diazol-4-yl) amino]-2 deoxy-glucose (2-NBDG) de Life Technologies. El protocolo seguido se describe a continuación:

1. Se lavan las células con medio SGG (sin rojo fenol y con glucosa a una concentración 0.5 mM).
2. Se incuban las células a 37°C y un 5% de CO₂ durante 30 minutos con el medio SGG especial, con el objetivo de que se estabilicen los gradientes de iones.
3. Se añade la 2-NBDG a una concentración final de 100 μM y se incuban durante 30 minutos protegidas de la luz.
4. Se cambia el medio por medio SGG especial y se incuban durante 5 minutos.
5. Se lavan las células con medio SGG especial y se procede a la toma de imágenes en el microscopio confocal Zeiss LSM 880 con el objetivo 40X. Excitación/emisión ~ 467/544 nm.
6. Para cuantificar el transporte de glucosa hasta el citoplasma se determina la intensidad fluorescencia en el citoplasma celular mediante el software *ImageJ*. Se determina el ROI, y a continuación se selecciona *Analyse>Measure* o sencillamente se pulsa la tecla M. Se mide la intensidad del fondo de la imagen para obtener un valor blanco, que luego se restará a los valores de intensidad de todas las células de la misma imagen.

15.7. Medición de los niveles de hierro intracelular

El hierro es el elemento metálico de transición más abundante dentro de un organismo y muestra diversas actividades fisiológicas. El hierro en su estado redox estable existe

en ion ferroso y en ion férrico. El Fe^{2+} es relativamente soluble y altamente reactivo, participa en muchas funciones celulares como la síntesis de mielina, la síntesis de neurotransmisores y el metabolismo oxidativo; pero también puede catalizar la producción de ROS que puede ser altamente tóxico. El Fe^{3+} es insoluble y normalmente se encuentra almacenado en el citoplasma en complejos moleculares conocidos con el nombre de ferritina.

Ferroorange

Los iones ferrosos se hallan en el interior de las células formando complejos conocidos como LIP o débilmente fijados a compuestos de bajo peso molecular como ATP, ADP, GTP o citratos. Para medir los niveles de hierro intracelular se ha utilizado la sonda fluorescente FerroOrange de Dojindo, la cual permite obtener imágenes fluorescentes de Fe^{2+} intracelular en células vivas. El protocolo seguido en condiciones de esterilidad y protegiendo de la luz ha sido el siguiente:

1. Previamente, el vial con 24 μg de FerroOrange se resuspende en 35 μl de DMSO (stock 1 mM). Para preparar la solución de trabajo justo antes del experimento la sonda FerroOrange se debe diluir en HBSS⁺ (con glucosa y HEPES) a una concentración 1 μM .
2. Se lavan las células tres veces con el medio HBSS⁺.
3. Como control positivo se prepara sulfato de hierro y amonio (II) (10 mM) y se añaden 2 μl por pocillo de placa de 24 (concentración final de 100 μM).
4. Se incuban las células durante 30 minutos en el incubador a 37°C y 5% de CO_2 .
5. Se lavan las células tres veces con el medio HBSS⁺.
6. Se tiñen las células con FerroOrange (1 μM) en la solución HBSS⁺ (200 μl) y se incuban durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO_2 . Como control negativo se añade 2,2'-bipiridilo (BPY) (100 μM) a las células, junto con la sonda FerroOrange y se incuban durante 30 minutos.
7. Inmediatamente después (sin lavar las células) se observan in vivo bajo el microscopio confocal Zeiss LSM 880 con el objetivo 25X y el láser Texas Red. Excitación/emisión $\sim 566/616$ nm.
8. Para cuantificar los niveles de hierro intracelular se determina la intensidad fluorescencia en el citoplasma celular mediante el software *ImageJ*. Se determina el

área de interés (ROI), y a continuación se selecciona *Analyse>Measure* o sencillamente se pulsa la tecla M. Se mide la intensidad del fondo de la imagen para obtener un valor blanco, que luego se restará a los valores de intensidad de todas las células de la misma imagen.

Mitoferrogreen

En las mitocondrias, a partir de los iones ferrosos, se sintetizan grupos de Fe-S y proteínas hemo. Para medir los niveles de hierro mitocondrial se ha utilizado la sonda fluorescente Mito-FerroGreen de Dojindo, la cual permite obtener imágenes fluorescentes de iones ferrosos en las mitocondrias de células vivas. El protocolo seguido en condiciones de esterilidad y protegiendo de la luz ha sido el siguiente:

1. Previamente, el vial con 50 µg de Mito-FerroGreen se resuspende en 53 µl de DMSO (stock 1 mM). Para preparar la solución de trabajo justo antes del experimento la sonda Mito-FerroGreen se debe diluir en HBSS⁺ (con glucosa y HEPES) a una concentración de 5 µM. Las soluciones de Mito-FerroGreen 1 mM y 5 µM son inestables, por lo que se preparan justo antes del experimento. También se puede utilizar etanol para la preparación, ya que la solución es estable a -20°C durante 2 semanas.
2. Se lavan las células tres veces con el medio HBSS⁺.
3. Se tiñen las células con Mito-FerroGreen (5 µM) en la solución HBSS⁺ (200 µl) y se incuban durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂.
4. Se lavan las células tres veces con el medio HBSS⁺.
5. Como control positivo se prepara sulfato de hierro y amonio (II) (10 mM) y se añaden 2 µl por pocillo de placa de 24 (concentración final de 100 µM).
6. Se incuban las células durante 1 hora en el incubador a 37°C y 5% de CO₂.
7. Se lavan las células tres veces con el medio HBSS⁺ y se observan bajo el microscopio confocal Zeiss LSM 880 con el objetivo 25X. Excitación/emisión ~ 488 nm/ 500-550 nm.
8. Para cuantificar los niveles de hierro intracelular se determina la intensidad fluorescencia en el citoplasma celular mediante el software *ImageJ*. Se determina el ROI, y a continuación se selecciona *Analyse>Measure* o sencillamente se pulsa la tecla M. Se mide la intensidad del fondo de la imagen para obtener un valor blanco,

que luego se restará a los valores de intensidad de todas las células de la misma imagen.

16. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de todos los experimentos mostrados en este trabajo se ha utilizado un mínimo de 3 réplicas independientes ($n \geq 3$) y, los datos se han presentado con la media y el error estándar de la misma ($\pm$ S.E.M.). Se ha determinado normalidad de las muestras mediante la prueba Shapiro-Wilk test y, para la comparación de medias entre dos grupos se ha llevado a cabo mediante la prueba t de Student de dos colas para muestras independientes. Para las comparaciones múltiples, entre más de dos grupos, se ha llevado a cabo el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por el test post-hoc de Tukey. Y, para la comparación de múltiples grupos que no siguen una distribución normal se ha llevado a cabo la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples Dunn's.

17. Materiales: Reactivos, kits y equipos utilizados.

En los siguientes apartados se detallan los diferentes materiales utilizados a lo largo de este trabajo:

17.1. Medios de cultivo celular y suplementos.

Medios comerciales:

Nombre	Abreviatura	Fabricante	Referencia
Dulbecco's Modified Eagle Medium 4,5g/l glucosa	DMEM	Gibco	1190-044
Hank's Balanced Salt Solution	HBSS	Gibco	14025-050
Minimum Essential Medium	MEM	Gibco	21090-022
Neurobasal A Medium 1x	NBA	Gibco	10888-022
OptiMEM I	OptiMEM	Gibco	31985-047

Suplementos y sales:

Nombre	Abreviatura	[Stock]	Fabricante	Referencia
Ácido quinurénico	-	10 mM	Sigma	K3375-1G
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	7.50%	Sigma	S8761-500ML
Cloruro de calcio	CaCl ₂	1M	Sigma	21098
Cloruro de magnesio	MgCl ₂	2M	Sigma	M8266
Cloruro de potasio	KCl	3M	Panreac	131494
Cloruro de sodio	NaCl	5M	Sigma	C8267
Glicina	-	1M	Appllichem	A3707
Glucosa	-	2,5M (45%)	Sigma	G8769
HEPES	-	1M	Lonza	BE13-737
Hidróxido de sodio	NaOH	1M	Sigma	221465
Insulina-Transferrina-Selenio	ITS	100X	Gibco	51500-056
L-Cisteína	-	-	Sigma	C7352
L-Glutamina	L-Gln	200 mM	Lonza	17905C
Penicilina/ Estreptomicina	P/E	10.000U/ml (10.000µl/ml)	Lonza	DE17602F
Piruvato sódico	Pyr	100 mM	Lonza	BE13-115
Rojo fenol	-	0.50%	Sigma	P0290
Suero fetal bovino	FBS	100%	Capricorn scientific	FBS-12B
Sulfato de potasio	K ₂ SO ₄	0,25M	Sigma	P0772
Sulfato de sodio	Na ₂ SO ₄	1M	Sigma	239313
Aminoácidos no esenciales(1X)	-	100x	Gibco	11140050

Medios de cultivo utilizados:

Medios o soluciones	Composición	T°C
Medio NBA (1%)	NBA, 1% FBS, 50U/ml P/E, 1 mM L-Gln, 1X B-27	4°C
Solución SGG	Para 1L: 22,8ml NaCl 5M, 29,2 ml NaHCO ₃ 7,5%, 1,764 ml KCl 3 M, 0,502ml MgCl ₂ 2M, 2ml CaCl ₂ 1M, 10ml Hepes 1M, 1ml Glicina 1M, 12ml Glucosa 2,5M, 5ml piruvato de sodio 0,1M, 2ml rojo fenol 0,5%	4°C
Medio bajo soporte tráfico (TMO)	Para 200ml: 178ml SGG, 20ml MEM, 1ml P/E	4°C
Medio de transfección (TMITS)	Para 200ml: 176ml SGG, 20ml MEM, 1ml P/E, 3ml ITS	4°C
Medio TMITS + FBS 2%	Para 200ml: 176ml SGG (sin KCl ni glucosa), 20ml MEM, 1ml P/E, 3ml ITS. + FBS 2%, KCl 20 mM, Glucosa 30 mM	4°C

Medio de disociación (DM)	Para 500ml: 40,9ml Na ₂ SO ₄ 1M, 60ml K ₂ SO ₄ 0.25M, 1,46ml MgCl ₂ 2M, 0,126ml CaCl ₂ 1M, 0,5ml Hepes 1M, 1ml RF, 4ml Glucosa 2,5M	4°C
Medio DMEM 10% FBS	DMEM, 10% FBS, 100U/ml P/E, 2 mM L-Gln	4°C
Medio OptiMEM	OptiMEM, 4 ml de glucosa 2,5 M y 5 ml P/E	4°C
Medio MEM 10% FBS	MEM, 10% FBS, 100U/ml P/E, 2 mM L-Gln, 1X Aminoácidos no esenciales(100x)	4°C
Solución de ácido quinurénico (KyMg "K")	Para 80 ml, 158,56 mg ácido quinurénico, 5 ml agua bidestilada y autoclavada, 0,4 ml rojo de fenol 0,5%, 0,4 HEPES 1 M y 4 ml MgCl ₂ 2 M	-20°C
Solución de papaína (E)	Para 50 ml, 5ml ácido quinurénico, 45 ml medio de disociación, 22,5 mg L-cisteína y 500 U de papaína.	-20°C
Solución de disección (DM + K)	Para 40 ml, 36ml de medio de disociación y 4 ml de solución de ácido quinurénico.	4°C
Solución SGG (sin calcio, magnesio ni rojo fenol)	Para 1L: 22,8ml NaCl 5M, 29,2 ml NaHCO ₃ 7,5%, 1,764 ml KCl 3 M, 10ml Hepes 1M, 1ml Glicina 1M, 12ml Glucosa 2,5M, 5ml piruvato de sodio 0,1M	4°C
Solución HBSS (Ca ²⁺ Mg ²⁺)	A 97,22 mL de HBSS (Gibco, 14025-050) se añade 1,78 mL glucosa y 1 mL HEPES	4°C

17.2. Soluciones tampón.

Soluciones tampón	Abreviatura	Composición
Tampón fosfato salino 1X	PBS	NaCl 0,1M, KCl 2,6M, KH ₂ PO ₄ 1,4M, Na ₂ HPO ₄ 8 mM, pH=7,4
Tampón Tris salino 10X	TBS	NaCl 1,5M, Tris-Base 0,2M, pH=7,6
Tampón Tris-Acetato-EDTA 50X	TAE	Trizma base 2M, ácido bórico 1M, EDTA 50 mM
Tampón de electroforesis 10X	SDS-page	Para 2l: 288,26g Glicina, 60,56g Tris Base, 20g SDS, H ₂ O hasta 2l
Tampón de carga Laemmli 1.5X		Para 100ml: 9ml Tris 1M pH 6,8, 15ml Glicerol, 3g SDS, 7,5ml β-mercaptoetanol, 37,5mg Azul de Bromofenol, 68,5 ml H ₂ O Mili-Q
Tampón de carga Laemmli 5X		SDS 10%, glicerol 50%, β-mercaptoetanol 25%, azul de bromofenol 0.01%, Tris-HCl pH 6,8 1,5M
Tampón de transferencia 10X Tampón de lavado Western blot	TBS-Tween	Para 2l: 60,56g Tris, 288,26g Glicina, H ₂ O hasta 2l TBS 1X, TWEEN® 20 0,5%
Tampón de purificación AAVs		NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 8,0

Tampón de fijación PFA 3% con sacarosa		PBS1X, PFA3%, Sacarosa 4%
Solución de bloqueo con BSA		PBS1X, BSA 3%
Tampón de extracción de proteína		HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl 1,5 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100, 1:200 <i>Proteinase inhibitor Cocktail Set III</i> , 1:200 <i>Phosphatase inhibitor Cocktail II y III</i> , M-132 10 µM
Tampón Tris-borato- EDTA 10X	TBE	Trizma base 89 mM, ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM; pH = 8,3
Tampón de carga 20% Azul de Bromofenol		20% Azul de Bromofenol, 10 g sacarosa en 20 ml 1× TBE; pH = 8,6

17.3. Enzimas, reactivos químicos y productos varios.

Enzimas:

Nombre	[Stock]	Fabricante	Referencia
Tripsina-EDTA	0,25%	Sigma	T4049
Papaína	≥16 U/mg proteína	Sigma	P3125-100MG
T4 DNA Ligase		Promega	M1801
Benzonase® Nuclease	≥250 u/µL	Sigma	E1014-5KU
L-Lactate Dehydrogenase from rabbit muscle	7.5u/µl	Sigma	10127230001
HindIII	10u/µl	NEB	R6045
EcoRV	10u/µl	NEB	R6355
BamHI	10u/µl	NEB	R0136
EcoRI	10u/µl	ThermoFisher	ER0271

Reactivos químicos:

Nombre	Abreviatura	Fabricante	Referencia
4',6-diamidine-2-phenylidole- dihydrochloride	DAPI	Roche	#10236276001
Agarosa		Sigma	A2576
GelRed, 10000x		Biogen	41003
β-mercaptoethanol		Sigma	M6250
Bovine Serum Albumin	BSA	Sigma	A2153-100G
Etanol	EtOH	Panreac	212801.0716
Etanol absolute RNAsa free	EtOH	Panreac	A8075,2500PE
Metanol	MetOH	Panreac	141091
Paraformaldeído	PFA	Sigma	P6146-1KG
Ácido clorhídrico 37%	HCl	Panreac	131020
Agua libre de nucleasas		Promega	P119E

Sodium azide		Merck	26628-22-8
Triton X-100		Sigma	X-100
Boric acid		sigma	B0394
Trizma® hydrochloride	Tris-HCl	Sigma	T3253
1kb DNA Ladder		Promega	G571A
RNAlater™ Stabilization Solution	RNAlater	Invitrogen	AM7021
JM109 Competent Cells		Promega	L2001
LB Broth	LB	Sigma	L3022-1KG
LB Agar, Ready-Made Powder	LB Agar	affymetrix-USB	75851-1KG
Lipofectamine™ 2000		Invitrogen	11668019
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Spectra BR	Thermo Scientific™	26634
Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution	Acrilamida	Sigma	A3574-100ML
Ammonium persulfate 10%	APS	Sigma	A3678-25G
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	TEMED	Sigma	T9281-100ML
Membrana Immobilon-P	PVDF	Merck	IPVH00010
TWEEN® 20		Sigma	P1379
X-Ray film		AGFA	XDAOG
ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution, 10X	ReBlot Solution	Sigma	2502
HiTrap® Heparin High Performance		Sigma	GE17-0406-01
Sodium deoxycholate monohydrate		Sigma	D5670-5G
Amicon Ultra centrifugal filter units, Ultra-4		Sigma	Z648043-24EA
Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters, 10K		Merck	UFC501096
β-Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (48 mM)		Sigma	N1511-250MG
VECTASHIELD Antifade Mounting Medium		Vector laboratories	H-1200
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate		sigma	A6419
CellLytic™ M		Sigma	C2978
Nonidet-P40		Fluka	74385
Dimethyl sulfoxide	DMSO	Sigma	D2650
Bicuculline (50 mM)	Bic	Sigma	14340
4-Aminopyridine (250 mM)	4-AP	Sigma	275875
2-deoxyglucose	2-DG	Sigma	D8375
Cycloheximide (10 mM)	CHX	Sigma	C7698
2,2'-Bipyridyl	BPY	Sigma	D216305
Carbonyl cyanide 3-Chlorophenylhydrazone (1 μM)	CCCP	Sigma	C2759

Sodium oxamate		Sigma	O2751
Forskolin (10 mM)	FSK	Sigma	F6886-10MG
2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) Amino)-2-Deoxyglucose	2-NBDG	Life Technologies	N13195
Fluo-4, AM, cell permeant	Fluo-4	Life Technologies	F14201
Hidrobromuro de Poli-D-Lisina (1mg/ml)	PL	Sigma	P6407
Laminina (1mg/ml)		Sigma	L2020
Filtros PES 0,22 µm 500 ml		Biofil	FPE204500
Filtros PES 0,22 µm 1L		Sigma	FPE204500
Filtros Millex-GP 0,22 µm		Merck	SLGP033RS
Filtros Millex-GV 0,22 µm		Merck	SLGV033RS
Protease Inhibitor Cocktail Set III, 200X		Merck	539134
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II, 200X		Sigma	524625
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set III, 200X		Sigma	524627-1ML
Ácido N-metil-D-aspartico	NMDA	Sigma	M3262
Ampicilina	Amp	Gibco	11593
Kanamicina	Kan	Sigma	60615
Arabinósido de citosina	AraC	Sigma	C6645
Benzonase endonuclease		Sigma	E1014
Dodecilsulfato Sódico	SDS	Sigma	L5750
Glicerol		Panreac	131339
Pluronic F-127 (20% en DMSO)	Pluronic	ThermoFisher	P3000MP
Superfrost Plus Adhesion Microscope Slides		ThermoFisher	J1800AMNT
Tetramethylrhodamine methylester	TMRM	Sigma	T5428
TriPure Isolation Reagent		Roche	11667157001
Ionicina		Sigma	10634
Mito-FerroGreen		Dojindo	M489
FerroOrange		Dojindo	F374
Ácido 2-tiobarbitúrico	TBA	Merk	10811800025
Ácido tricloroacético	TCA	Merk	1008070100
2-Butanol		Panreac	123851
El ácido oxálico		Sigma	75688-50g
Hemina		Sigma	51280-1G
Sulfato de hierro y amonio (II)		Sigma	215406-100G
Falcon® 96-well Black Flat Bottom TC-treated Microplate		Corning	353376
Lactato de sodio		Sigma	L7022
Phenazine methosulfate	PMS	Sigma	P9625
Nitro blue Tetrazolium Chloride	NBT	Invitrogen	N6495

βDinucleótido de β-nicotinamida		Sigma-Aldrich	N7004-1G
Ácido bórico		Panreac	131015.121
Azul de Bromofenol		Sigma	B8026
Sacarosa		Sigma	S0389
EDTA		Sigma	E5134
EGTA		Sigma	E4378
Hidracina		Sigma	225819
Rosiglitazona	RSG	MedChemExpress	HY-17386
Cannabidiol	CBD	TOCRIS	1570
Honokiol		Sigma	42612
Nifedipine		Sigma	N7634
MK 801		Calbiochem	475878
GSK-690693		TOCRIS	4144
API-2		TOCRIS	2151
MG-132		Sigma	M7449

17.4. Plásmidos

Nombre	Origen	Referencia	Resistencia	Descripción
pΔ6	Hilmar Bading	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)	Ampicilina	Generación de AAVs
pRV1	Hilmar Bading	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)	Ampicilina	Generación de AAVs
pH21	Hilmar Bading	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)	Ampicilina	Generación de AAVs
AAV-shSC	Hilmar Bading	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)	Ampicilina	small hairpin RNA control (AAV)
GFP	Dr. Giles Hardingham	(Hasel <i>et al.</i> , 2017)	Kanamicina	Proteína GFP
ICER	Giles Hardingham	(Hasel <i>et al.</i> , 2017)	Ampicilina	Proteína ICER. Inhibidor CREB.
mitoRED	Dr. Antonio Zorzano	(Legros <i>et al.</i> , 2002)	Ampicilina	Marcaje con RFP de mitocondrias
TK-Renilla	Promega (E2241)		Ampicilina	Renilla bajo el promotor TK
shSC (-GFP)	Creación propia		Ampicilina	Plásmido AAV sin GFP expresa shRNA control
CMV-Renilla	Promega (E2261)		Ampicilina	Renilla bajo el promotor CMV
pAAV-GFP	Hilma Bading	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)	Ampicilina	Plásmido AAV que expresa GFP
pAAV-A-CREB	Hilma Bading	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)	Ampicilina	Plásmido AAV con GFP que expresa un dominante negativo de CREB

MitoGFP	Dr. Antonio Zorzano		Ampicilina	Marcador mitocondria unido a GFP
mCherry-NLS	Creación propia		Kanamicina	mCherry con secuencia de localización nuclear
PPAR- γ	Addgene (8895)	(Hauser et al., 2000)	Ampicilina	Proteína PPAR gamma
PPRE-X3-TK-Luc	Addgene (1015)	(Kim et al., 1998)	Ampicilina	PPRE unida a luciferasa (indicador de actividad) bajo promotor TK
pER-Renilla	Creación propia		Ampicilina	Renilla bajo el promotor EF
AAV-shMfrn1	Creación propia		Ampicilina	Plásmido AAV con GFP que expresa shRNA contra Mfrn1
AAV-shMfrn1 sin GFP	Creación propia		Ampicilina	Plásmido AAV sin GFP que expresa shRNA contra Mfrn1

17.5. Anticuerpos

Nombre	Especie	[]	Técnica	Casa comercial	Referencia
α GFP	Conejo	1:750	WB/ICF	Invitrogen	A11122
α Actina	Ratón	1:1000	WB	Sigma	A4700
α HIF-1 α	Conejo	1:2000	WB	Abcam	ab179483
α VDAC	Ratón	1:1000	WB	Abcam	Ab14734
α H3	Conejo	1:1000	WB	ABclonal	A2348
α Pan-AKT	Conejo	1:5000	WB	ABclonal	A18675
α H3K18lac	Conejo	1:1000	WB	PTM BIO	1406RM
α Phospho-AKT-S473	Conejo	1:1000	WB	ABclonal	AP1208
α Tubullin	Ratón	1:1000	WB	Sigma	T9026
α LDHA	Conejo	1:1000	WB	ABclonal	A0861
α LDHA	Conejo	1:1000	WB	Proteintech	21799-1-AP
α LDHB	Conejo	1:1000	WB	ABclonal	A18096
α Methylglyoxal	Ratón	1:1000	WB	Sigma	SAB5202580
α Mitoferrin1	Ratón	1:5000	WB	Sigma	ABS1051
α Aconitase 1	Conejo	1:1000	WB	ABclonal	A4821
α IRP2	Conejo	1:1000	WB	ABclonal	A22283
α Mouse-HRP	Cabra	1:5000	WB	Sigma	A4416
α Rabbit-HRP	Cabra	1:5000	WB	Sigma	A6154
α Goat-HRP		1:5000	WB	Sigma	
Biotin Sp-conjugated α Mouse	Burro	1:200	ICF	Jackson Immuno Research	715-065-150
Biotin Sp-conjugated α Rabbit	Burro	1:200	ICF	Jackson Immuno Research	715-065-152

CyTM3-conjugated Streptavidin		1:500	ICF	Jackson Immuno Research	016-160-084
A488-conjugated Streptavidin		1:500	ICF	Jackson Immuno Research	016-540-084
α Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Pollo	1:400	ICF	Invitrogen	A-21200

17.6. Primers

Para la realización de PCR de genotipado y qPCR se han utilizado los siguientes primers:

Secuencia 5' - 3'	Orientación	Gen	Especie	Uso
AGCCTGTTCTCATACCTCGG	Forward	NdufsWT	Ratón	PCR (Genotipado)
GTCCTCTATGAGGGTACAGAG	Reverse	NdufsWT	Ratón	PCR (Genotipado)
GGTGCATACTTATACTACTAGTAG	Reverse	NdufsKO	Ratón	PCR (Genotipado)
CACCTTCTTCAAAGTCCCGGA	Forward	Glut3	Ratón	qPCR
ATGCTGTTCAACTCCACACCG	Reverse	Glut3	Ratón	qPCR
CTTGCGAATATGGTTGCCTCA	Forward	HK2	Ratón	qPCR
CCTCCAATGCCTGATCTGAT	Reverse	HK2	Ratón	qPCR
TCTGTACCGTGGCATCTTCC	Forward	PKM	Ratón	qPCR
GCCCAGAGTGAGCACTACAA	Reverse	PKM	Ratón	qPCR
TTCTCAGGTTTTTGC GGAGAAC	Forward	PFKFB3	Ratón	qPCR
GTGCACATGTATGAGCTGGCA	Reverse	PFKFB3	Ratón	qPCR
TGTTAGTCGGAGCCTTCATTTC	Forward	MCT1	Ratón	qPCR
CACTGGTCGTTGCACTGAATA	Reverse	MCT1	Ratón	qPCR
TCACGGGTTTCTCCTACGC	Forward	MCT4	Ratón	qPCR
GCCAAAGCGGTTACACAC	Reverse	MCT4	Ratón	qPCR
CACCACCTCCAGTCAGATCG	Forward	MCT2	Ratón	qPCR
CTCCCACTATCACCACAGGC	Reverse	MCT2	Ratón	qPCR
CAAAGTCCAAGATGGCAACCC	Forward	LDHA	Ratón	qPCR
AGCACCAACCCCAACAACCTGT	Reverse	LDHA	Ratón	qPCR
ATTGCGTCCGTTGCAGATG	Forward	LDHB	Ratón	qPCR
TCCCAGAATGCTGATGGCA	Reverse	LDHB	Ratón	qPCR
AGGACATCCAAGACAACCTGC	Forward	PPAR γ	Ratón	qPCR
TCTGCCTGAGGTCTGTCATC	Reverse	PPAR γ	Ratón	qPCR
GTGGAGCGATTTGTCTGGTT	Forward	18S	Ratón	qPCR

CAAGCTTATGACCCGCACTT	Reverse	18S	Ratón	qPCR
GTGGAGCGATTTGTCTGGTT	Forward	18S	Rata	qPCR
CAAGCTTATGACCCGCACTT	Reverse	18S	Rata	qPCR
GTATGGCCACCCTACTCCAC	Forward	Mfrn1	Rata	qPCR
GCAATCGCTGTTTCACCAC	Reverse	Mfrn1	Rata	qPCR
CGGCCAGTGATGAGTGAGT	Forward	DMT	Rata	qPCR
AGCAGACGAGAAGGACCAAG	Reverse	DMT	Rata	qPCR
ACCCACTGTGGAAATGGATG	Forward	Gpx4	Rata	qPCR
GACCATAGCGCTTCACCAC	Reverse	Gpx4	Rata	qPCR
GACCATAGCGCTTCACCAC	Forward	4F2	Rata	qPCR
TCATTCCACAGCATGAATGG	Reverse	4F2	Rata	qPCR
TCATTCCACAGCATGAATGG	Forward	XCT	Rata	qPCR
CCCTTCTCGAGATGCAACAT	Reverse	XCT	Rata	qPCR
CCCTTCTCGAGATGCAACAT	Forward	Tfrf	Rata	qPCR
TCCAGCCTCACGAGGAGTAT	Reverse	Tfrf	Rata	qPCR
GCCAGAACTTTCACCCAGAC	Forward	FTMT	Rata	qPCR
GGATGCGTAAAGCTCCATGT	Reverse	FTMT	Rata	qPCR
GCAAACTACCTGACCTCAGCA	Forward	Fpn	Rata	qPCR
ACTGCAAAGTGCCACATCC	Reverse	Fpn	Rata	qPCR
GGATGTGTGGCAACGTTACTT	Forward	Mfrn2	Rata	qPCR
TCCGCTTGACCACTT	Reverse	Mfrn2	Rata	qPCR
TTGAATCCAGATCCCAAAGC	Forward	Mfrn1	Ratón	qPCR
GTTTCCTTGGTGGCTGAAAA	Reverse	Mfrn1	Ratón	qPCR
TGTTAGGCCCAATTCAAGAAGC	Forward	4F2	Ratón	qPCR
TGGGAGCCCAAAGTGGGATT	Reverse	4F2	Ratón	qPCR
GACGATGGTGATGCTCTTCT	Forward	XCT	Ratón	qPCR
TGGGCGTTTGTATCGAAGATA	Reverse	XCT	Ratón	qPCR

Para la realización de shRNAs se han utilizado las siguientes secuencias

Nombre	Orientación	Secuencia 5' - 3'
ShMfrn1.2F	Forward	GATCCGCCTGAACGTGATGATGATTTCAAGAGAATCATCA TCACGTTCAAGCTTTTTTGAAGAATTCA
ShMfrn1.2R	Reverse	AGCTTGAATTCTTCAAAAAAGCCTGAACGTGATGATGAT TCTCTTGAAATCATCATCACGTTCAAGCG

17.7. Kits

Nombre	Fabricante	Referencia
Pierce™ BCA protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23225
GoTaq® G2 Green Master Mix	Promega	M7822
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega	A6002
PureLink™ RNA Mini Kit	Invitrogen	12183025
Superscript™ III First-Strand Synthesis SuperMix	Invitrogen	11752-50
UltraScript™ cDNA Synthesis Kit de	PCR BIOSYSTEMS	pb30.11-10
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega	A9282
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems™	4337454
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad	170-5061
ATPlite Luminescence Assay System	PerkinElmer	6016943
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega	E2920
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen	12643
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12663
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma	PLN70
RNeasy MinElute Cleanup Kit	Quiagen	74204
MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay	Agilent	MX-200-4
NAD ⁺ /NADH Glo Assay	Promega	G9071

17.8. Equipos

Equipo	Casa comercial
Lupa binocular StereoBlue	Euromex
Termociclador PCR	Eppendorf
Termociclador de PCR a tiempo real, StepOnePlus™	Applied Biosystems
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
Homogeneizador (tipo <i>tight-fitting glass-Teflon homogenizer</i>)	OMNI TH
Cabinas Bio-II-A	Telstar
Incubadora Galaxy 170 S	Eppendorf

Microcentrífuga refrigerada	Eppendorf
Ultracentrífuga refrigerada Jouan CR4.12	Thermo Fischer Scientific
Fluorímetro Infinite® M200PRO	Tecan
Microscopio óptico Axiovert 40 C	Zeiss
Microscopio de fluorescencia	Olympus BX61/BX62
Microscopio Confocal Zeiss LSM 880	Zeiss
Microscopia de fluorescencia invertido Leica DM IRB	Leica
ChemiDoc Imaging System	BioRad
Agitador termoregurable	Eppendorf
Cámara Leica DFC550	Leica
Cámara Olympus DP70	Olympus
Citometro de flujo SORTER FUSION	BD Biosciences
Depurador de agua milliQ	Merck
Placa NanoQuant	Tecan
Transiluminador UV	UVP
Ultracentrífuga refrigerada Sorvall RC 5C Plus	Marshall Scientific

RESULTADOS

1. La actividad sináptica regula el metabolismo del hierro mitocondrial para mejorar la bioenergética neuronal.

1.1. La actividad sináptica incrementa los niveles de Fe²⁺ intracelular.

La actividad sináptica requiere grandes cantidades de energía para mantener el impulso sináptico [65]. Con el fin de suplir el consiguiente incremento en el consumo de energía, la actividad sináptica promueve toda una serie de cambios a nivel metabólico en las diferentes regiones del cerebro [366, 367]. Se empieza a entender cómo se suministra energía durante la actividad sináptica [65, 88, 368], sin embargo, no se sabe mucho sobre las adaptaciones a largo plazo de la actividad sináptica en el metabolismo neuronal. En este apartado, por tanto, se estudiaron las adaptaciones centrándonos en el hierro, pues el hierro es necesario para el metabolismo oxidativo y episodios de actividad sináptica se ha visto que mejoran la captación de hierro por parte de la neurona [369-371]. Para ello, se estimuló la actividad sináptica en cultivos primarios de neuronales corticales de rata mediante un método establecido de desinhibición de la red aplicando el tratamiento combinado del antagonista de los receptores inhibitorios de GABA, la bicuculina (Bic), y el antagonista de los canales de K⁺, la 4-aminopiridina (4-AP) [372]. Tras 24 horas de estimulación se analizó el hierro intracelular mediante un ensayo colorimétrico basado en ferrozina y un sensor fluorescente de hierro ferroso (Fe²⁺) dirigido al citoplasma y, se observó que las neuronas estimuladas presentaban un incremento en los niveles de hierro intracelular (Figura 44A, B, C). Dado que las mitocondrias desempeñan un papel vital en el metabolismo celular del hierro [18], se analizó el hierro mitocondrial con otro sensor fluorescente dirigido a las mitocondrias y se observó que el hierro mitocondrial de neuronas estimuladas también estaba aumentado (Figura 44D, E F). Dentro de las mitocondrias, el hierro se utiliza principalmente para la síntesis de grupos ISC y hemo, componentes esenciales de los complejos de la cadena de transporte de electrones y de algunas enzimas del ciclo de Krebs [373, 374]. De acuerdo con esto y, dado que el contenido de hierro mitocondrial se vio aumentado en neuronas estimuladas, se analizaron los niveles del grupo hemo en cultivos neuronales estimulados durante un periodo de 24 horas y, como puede comprobarse en la Figura 44G, los niveles del grupo

hemo se vieron aumentados. Por lo tanto, el aumento de los niveles de hierro mediado por la actividad sináptica estimula la síntesis del grupo hemo en neuronas activas.

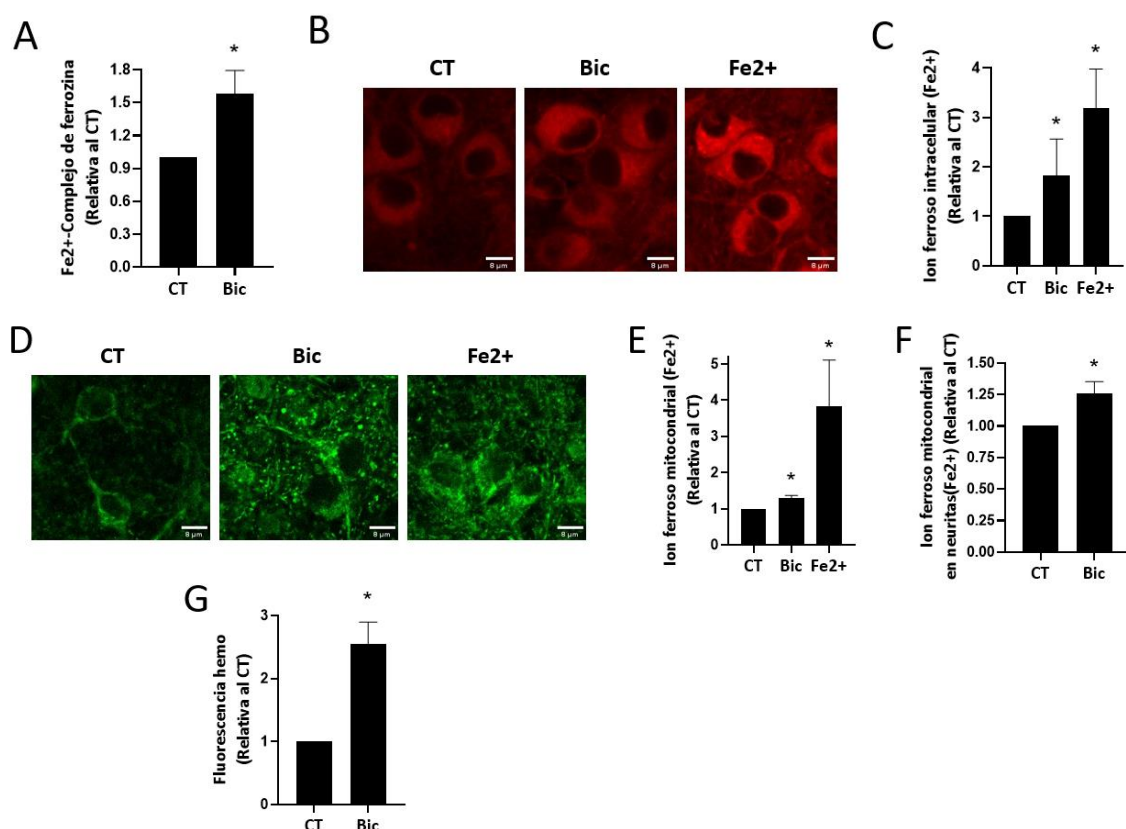


Figura 44: La actividad sináptica incrementa los niveles de hierro intracelular y mitocondrial. (A) Contenido de hierro ferroso en neuronas control no estimuladas y estimuladas durante 24 h utilizando el ensayo basado en ferrozina (n = 4 experimentos independientes). (B) Imágenes representativas de tinción con FerroOrange en neuronas control y neuronas estimuladas. Barra de escala = 8 μ m. (C) Contenido ferroso citoplásmico en neuronas control y estimuladas durante 24 h (n = 3 experimentos independientes). (D) Imágenes representativas de la tinción con Mito-FerroGreen en neuronas control y estimuladas. Barra de escala = 8 μ m. (E) Contenido ferroso mitocondrial en el soma y (F) las neuritas de neuronas control y estimuladas durante 24 h. (n = 4 experimentos independientes). (G) Contenido de grupo hemo en neuronas control no estimuladas y estimuladas durante 24 h (n = 4 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas.

1.2. El aumento de los niveles de hierro intracelular en las neuronas activas participa en el incremento de la capacidad bioenergética.

El grupo hemo, el cual contiene un ion Fe^{2+} , es necesario para el anclaje y la actividad de los complejos respiratorios, funcionando como cofactor metálico en varias enzimas involucradas en la transferencia de electrones de la OXPHOS [35, 40]. La actividad sináptica es el principal proceso consumidor de energía en el SNC [65]. Las neuronas con

actividad sináptica persistente experimentan una remodelación bioenergética para soportar esta alta demanda energética relacionada con la actividad [366, 367]. Por tanto, nos preguntamos si el incremento de hierro observado en neuronas activas es importante para su bioenergética. Para ello, se trataron las neuronas con 2,2'-bipiridilo (BPY), un compuesto orgánico que actúa como un quelante del hierro al hacer complejos con este e impidiendo así que participe en las funciones celulares. Se observó un incremento en el consumo de oxígeno basal y máximo (OCR) en neuronas activas, el cual era dependiente de hierro (Figura 45A y B), ya que el tratamiento con BPY perjudicó el aumento mediado por la actividad sináptica en el consumo de oxígeno basal y máximo.

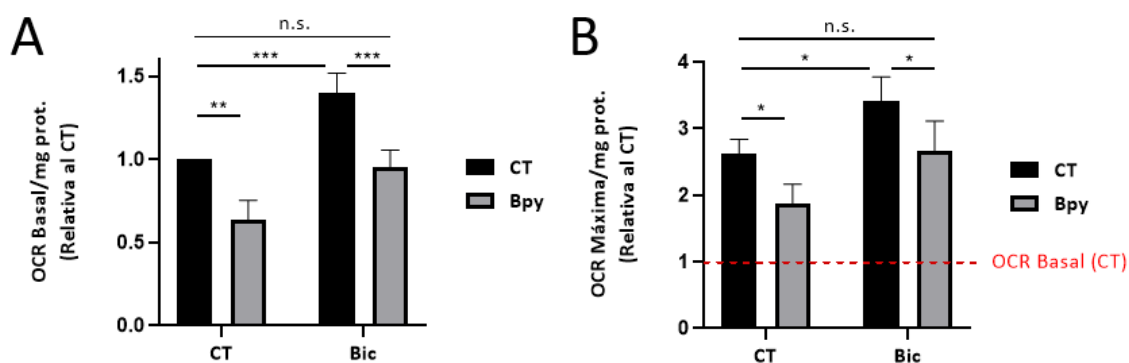


Figura 45: El aumento de los niveles de hierro intracelular en las neuronas activas participa en el impulso bioenergético. (A) Se analizó la tasa de consumo de oxígeno (OCR) basal y (B) máxima en neuronas control no estimuladas y estimuladas durante 24 h y tratadas o no con el quelante de hierro 2,2'-bipiridilo (BPY), 100 μ M) ($n = 4$ experimentos independientes). La línea discontinua roja indica OCR basal de neuronas en reposo. Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

1.3. La actividad sináptica induce la expresión transcripcional de genes del metabolismo del hierro.

La actividad sináptica, a través de la generación de transitorios de Ca^{2+} es un potente regulador de la expresión génica [375-377]. Para estudiar la posibilidad de que el incremento en la absorción de hierro inducido por la actividad sináptica requiera de la síntesis de nuevas proteínas, las neuronas fueron tratadas con cicloheximida (CHX), un inhibidor de la traducción del mRNA. Tal y como se observa en la Figura 46A-E la CHX bloqueó completamente el aumento de hierro intracelular y mitocondrial mediado por la actividad sináptica, lo que indica que los cambios transcripcionales podrían estar

asociados con una mayor absorción de hierro en las neuronas que han experimentado actividad sináptica. Por lo tanto, se analizaron los niveles de RNAm de diferentes genes implicados en el metabolismo del hierro, encargados de introducir o retener el hierro en la célula y, se observó una fuerte inducción de la proteína mitocondrial MFRN1 (Figura 47A-D), implicada en el transporte del hierro a la mitocondria y, una inducción más modesta en la expresión del gen del receptor TFRC1, necesario para la captación de hierro celular mediado por receptor, y DMT1, necesario para el transporte de hierro a través de la membrana endosómica hasta el citosol (Figura 47A).

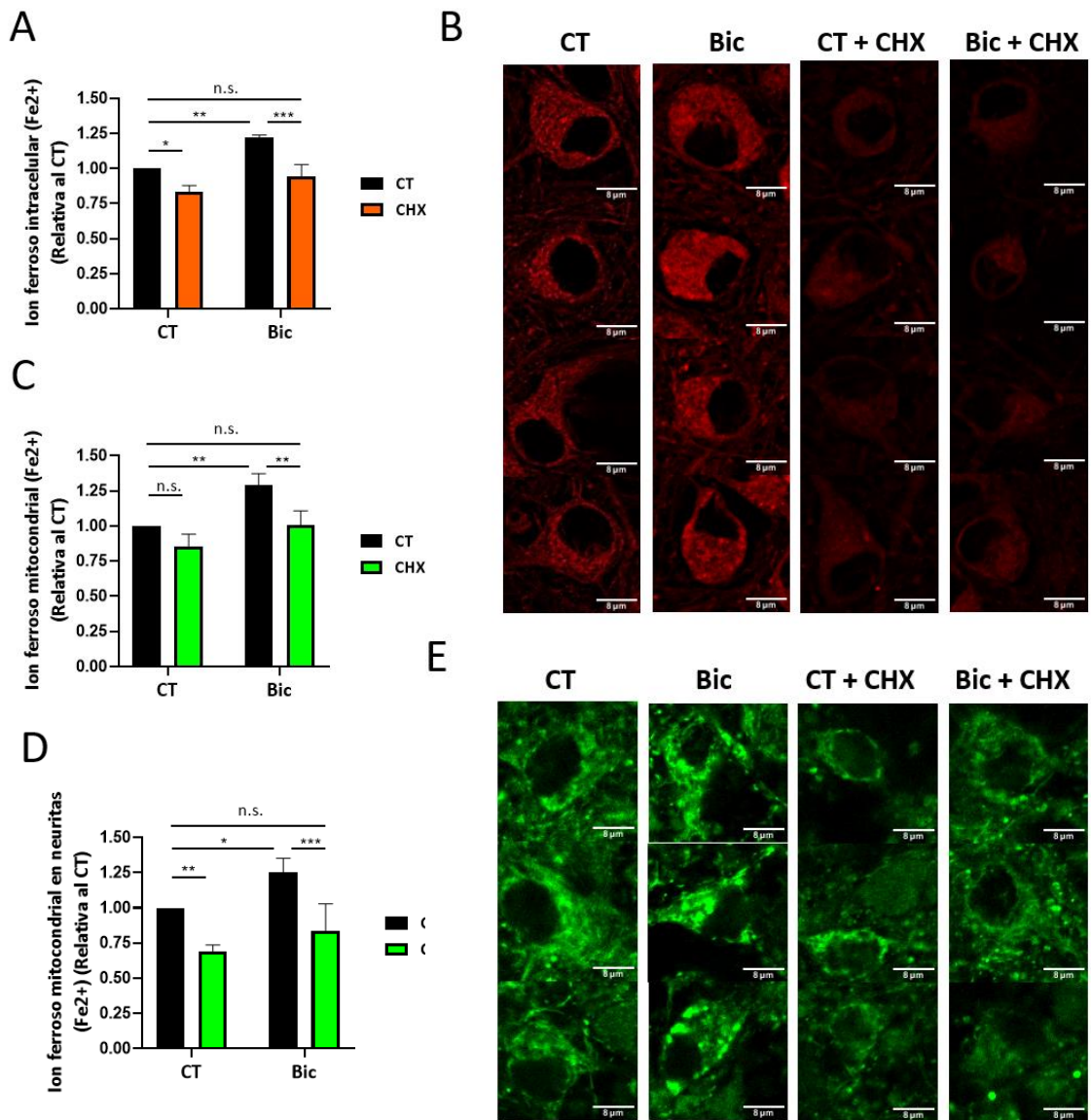


Figura 46: El incremento en la absorción de hierro inducido por la actividad sináptica requiere de la síntesis de nuevas proteínas. (A) Contenido de hierro ferroso citoplasmático en el soma de neuronas control y estimuladas durante 24 h en ausencia o presencia del inhibidor de la traducción cicloheximida (10 μM) como se indica (n = 3 experimentos independientes). (B) Imágenes representativas de tinción con FerroOrange en neuronas control y neuronas estimuladas en ausencia o presencia de CHX. Barra de escala

= 8 μ m. (C) Contenido de hierro ferroso mitocondrial en el soma (D) y en las neuritas de neuronas control y estimuladas durante 24 h en ausencia o presencia del inhibidor de la traducción cicloheximida (10 μ M) como se indica (n = 4 experimentos independientes). (E) Imágenes representativas de la tinción con Mito-FerroGreen en neuronas control y estimuladas en ausencia o presencia de CHX. Barra de escala = 8 μ m. Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * p < 0,05, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

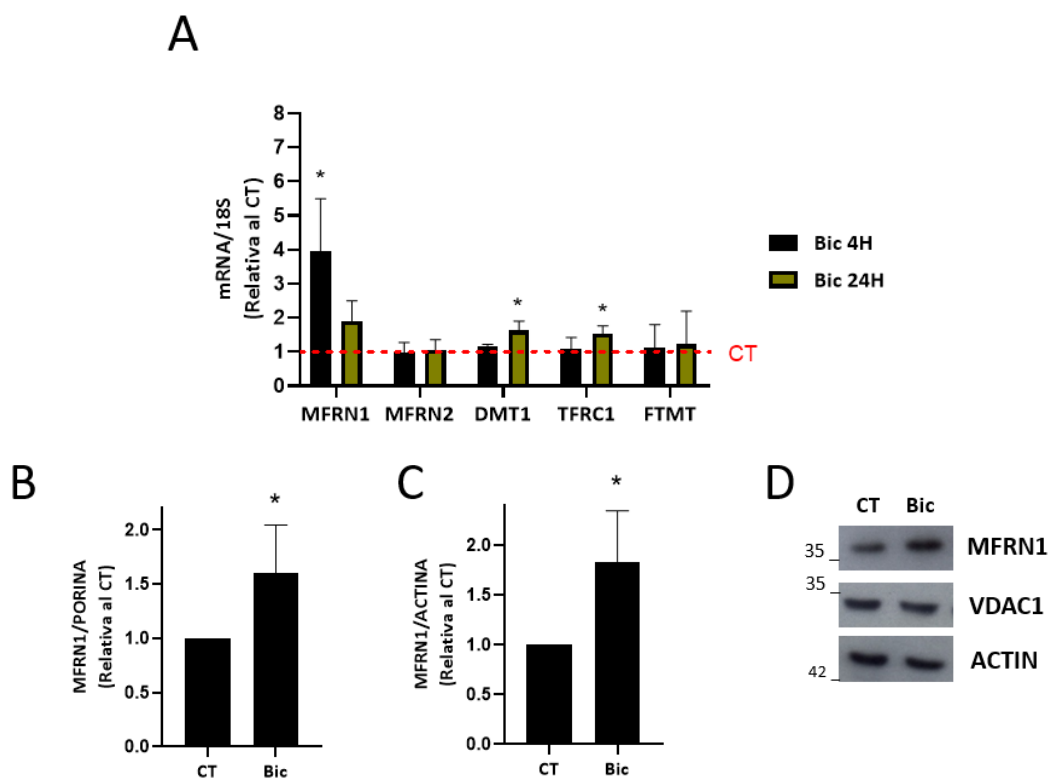


Figura 47: La actividad sináptica induce la expresión transcripcional de genes del metabolismo del hierro. (A) Las neuronas se estimularon durante 4 o 24 h y la expresión del RNAm de los genes indicados se determinó mediante qPCR (n = 4–8 experimentos independientes). La línea discontinua roja indica los niveles de RNAm en neuronas en reposo. (B, C) Tras estimular las neuronas corticales durante 24 horas se analizó por densitometría los niveles la proteína MFRN1 por Western blot (n = 4–5 experimentos independientes). (D) Imágenes representativas de western blot. Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. (D) Imágenes representativas de western blot.

1.4. La disminución de MFRN1 perjudica la bioenergética mitocondrial.

Los resultados presentados hasta ahora indican que la captación de hierro en las mitocondrias, promovida por la actividad sináptica, es importante para la bioenergética neuronal (Figura 44, Figura 45). El transportador de membrana mitocondrial MFRN1, el cual su expresión se ve inducida por la actividad, permite el paso de iones de hierro a las mitocondrias para ser utilizados para la formación de grupos ISC y hemo [20]. La escasez de hemo compromete la respiración mitocondrial, y las alteraciones en el contenido de

hierro mitocondrial perturban la producción de ATP mitocondrial [378,379]. Por lo tanto, para determinar si la mejora en la capacidad respiratoria mitocondrial dependiente de actividad se ve alterada al anular el aumento en la absorción de hierro mitocondrial, se bloqueó la inducción de MFRN1 mediante un AAV que expresa un shRNA dirigido a MFRN1 (AAV-shMFRN1) (Figura 48A, B). Como consecuencia funcional del bloqueo de la inducción dependiente de la actividad de MFRN1 por AAV-shMFRN1, las neuronas MFRN1 KD mostraron niveles reducidos de hierro mitocondrial (Figura 48C) y una disminución en la mejora de la bioenergética mitocondrial después de la estimulación (Figura 48D, E). Lo que indica que para la mejora la bioenergética mitocondrial en neuronas activas es necesario un aumento de la captación de hierro por parte de las mitocondrias.

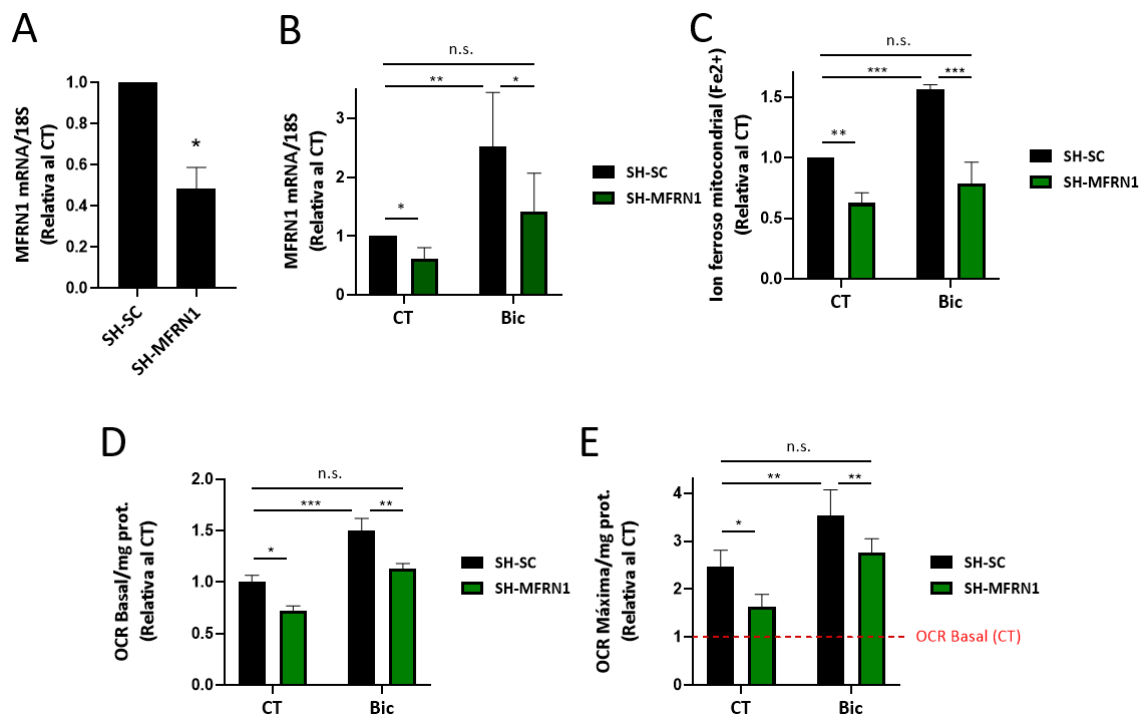


Figura 48: La disminución de MFRN1 perjudica la bioenergética mitocondrial. (A) Estimulación la expresión del RNAm de MFRN1 se determinó mediante qPCR en neuronas transducidas con AAV que expresan shRNA dirigido a MFRN1 (shMFRN1) o control de shRNA no dirigido (shsc). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. (B) Después de 4 h de estimulación la expresión del RNAm de MFRN1 se determinó mediante qPCR ($n = 6$ experimentos independientes). (C) El contenido ferroso mitocondrial se analizó en neuronas control transducidas con un AAV que expresaba un shRNA no dirigido (shsc) y en neuronas estimuladas durante 24 h transducidas con un AAV que expresaba un shRNA dirigido a MFRN1 (shMFRN1) ($n = 4$ experimentos independientes). (D) La OCR basal y (E) la OCR máxima se determinaron después de 24 h de estimulación ($n = 5$ experimentos independientes). La línea discontinua roja indica OCR basal de neuronas en reposo. Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

1.5. CREB regula la expresión de MFRN1.

CREB es un factor de transcripción involucrado en importantes procesos neurobiológicos, como la memoria, el aprendizaje y la supervivencia neuronal [375-377]. Este factor de transcripción es un poderoso regulador de la expresión génica mediada por la actividad sináptica. El patrón de expresión de MFRN1 después de la estimulación (Figura 47A) se asemeja al de los genes regulados por actividad dependientes de CREB [88, 380]. Para identificar el posible papel de CREB en la regulación de la inducción mediada por actividad se estudió el efecto CREB en la expresión del gen de MFRN1, primero se estudió el efecto de la activación de CREB en neuronas activas. Para ello se trataron las neuronas con el activador de adenilil ciclasa y, por tanto, con el activador CREB, forskolina y, se observó una fuerte inducción de MFRN1 (Figura 49A). Lo que indica que CREB podría estar regulando MFRN1 en neuronas activas, ya que el tratamiento con forskolina fue suficiente para inducir MFRN1. Además, a los 30 minutos de estimulación se observó una pequeña inducción significativa del RNAm de MFRN1 (Figura 49B), consistente con la rápida activación de CREB desencadenada por la actividad sináptica [76, 381]. El flujo de calcio a través del receptor NMDA (NMDAR) después de un breve episodio de actividad sináptica provoca la activación de CREB [355]. Por lo tanto, se estudió el efecto del bloqueo del flujo de calcio en neuronas activas. Para ello se trataron las células con el antagonista del NMDAR, MK-801, o con el bloqueador de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, nifedipina, y como puede comprobarse la Figura 49C, el bloqueo de los canales de calcio anuló la inducción dependiente de actividad de MFRN1. Lo que es otro indicador de que CREB podría regular MFRN1.

Seguidamente, para confirmar que CREB es el factor de transcripción mediante el cual la actividad sináptica induce MFRN1, se transdujeron las neuronas con AAV que expresa A-CREB, dominante negativo de CREB [382]. La expresión de A-CREB bloqueó la inducción mediada por la actividad de la expresión de MFRN1 (Figura 49D) y abolió la mejora dependiente de la actividad de la captación de hierro mitocondrial (Figura 49E). Lo que confirma el papel de CREB en la regulación de la expresión de MFRN1 dependiente de la actividad.

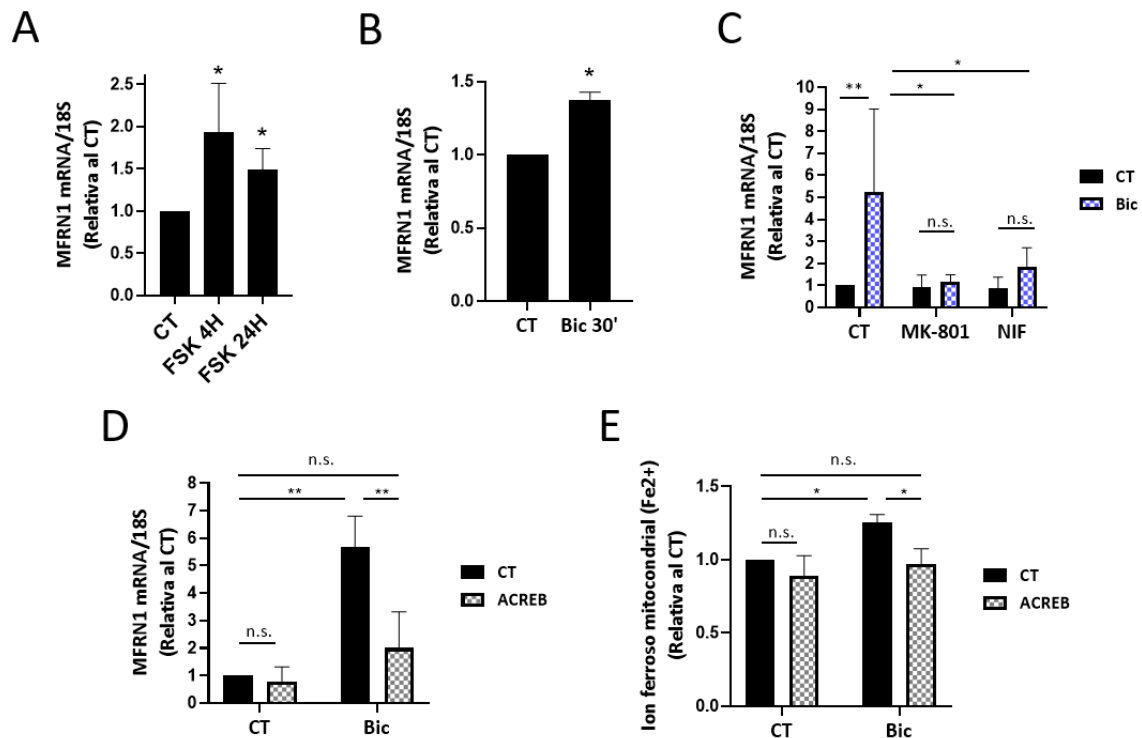


Figura 49: CREB regula la expresión de Mfrn. (A) Las neuronas se trataron con forskolina (FSK, 10 μ M) durante 4 h y 24 h y la expresión del RNAm de MFRN1 se determinó mediante qPCR (n = 4 experimentos independientes). (B) Las neuronas se estimularon durante 30 minutos y la expresión del RNAm de MFRN1 se determinó mediante qPCR (n = 4 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo. (C) Las neuronas se estimularon durante 4 h con o sin MK-801 (10 μ M) y Nifedipine (5 μ M), y la expresión del RNAm de MFRN1 se determinó mediante qPCR (n = 5 experimentos independientes). (D) Las neuronas se transdujeron con AAV que codifica el A-CREB negativo dominante, y después de 4 h de estimulación la expresión del RNAm de MFRN1 se determinó mediante qPCR (n = 3 experimentos independientes). (E) El contenido ferroso mitocondrial se analizó en neuronas control y transducidas con un AAV-CREB que se dejaron sin estimular o estimuladas durante 24 h. (n = 3 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

1.6. La actividad sináptica protege de la muerte celular por exceso de hierro.

En la célula, el exceso de hierro puede participar en la producción de ROS y desencadenar peroxidación lipídica en las membranas celulares a través de la reacción de Fenton, provocando un tipo regulado de muerte celular conocido como ferroptosis [242]. No obstante, la célula tiene un mecanismo de protección contra el daño oxidativo generado por la peroxidación lipídica. El sistema Xc⁻ compuesto por XCT y 4F2 permite la entrada a la célula de la cisteína, precursora del glutatión. Y, el glutatión en su forma

reducida sirve como cofactor para GPX4, una proteína clave en la defensa enzimática contra la peroxidación lipídica de la membrana [246]. Además, el metabolismo del hierro está estrictamente regulado mediante moléculas reguladoras clave. En el cerebro la homeostasis del hierro está regulada principalmente por los transportadores de hierro TFRC1 y DMT1, encargados de introducir el hierro a la célula, y Fpn, encargado de exportar el hierro fuera de la célula [236, 237]. Se ha visto que la mejora de la exportación celular de hierro hace que las células sean más resistentes a la ferroptosis [383, 384]. Como se ha podido observar en los resultados anteriores, la actividad sináptica desempeña un papel en el transporte del hierro dentro de las células, aumentando los niveles de hierro intracelular y mitocondrial (Figura 44) e induciendo la transcripción de genes implicados en el transporte de hierro al interior de la célula, TFRC1 y DMT1, y a las mitocondrias, MFRN1, (Figura 47A). Por lo tanto, se estudió si la actividad sináptica, además de aumentar los niveles de hierro intracelular, también activa programas de defensa contra la muerte celular por ferroptosis. Se analizó la expresión de diferentes genes implicados en el control de la ferroptosis, el sistema Xc-antiportador de cisteína-glutamato, la protección contra la peroxidación lipídica por el gen GPX4 y la exportación de hierro celular por el gen Fpn. Se observó que la actividad sináptica estimuló la expresión transcripcional del gen Fpn (Figura 50A), junto con la expresión de los genes del sistema Xc-antiportador de cisteína-glutamato XCT y 4F2, y el gen GPX4 (Figura 50B). También se observó que el gen Fpn presentó una inducción tras activar CREB con el activador de adenilil ciclasa, lo que indica que puede estar regulado por CREB (Figura 50C). Estos resultados sugieren que la actividad sináptica puede proteger contra la ferroptosis. Por tanto, se estudió la muerte por exceso de hierro en neuronas estimuladas y se observó que la actividad sináptica fue capaz de proteger de la muerte celular inducida por hierro ferroso (Figura 51). Estos resultados indican, por tanto, que la actividad sináptica, al tiempo que aumenta los niveles de hierro intracelular, regula coordinadamente un programa transcripcional para proteger contra la ferroptosis.

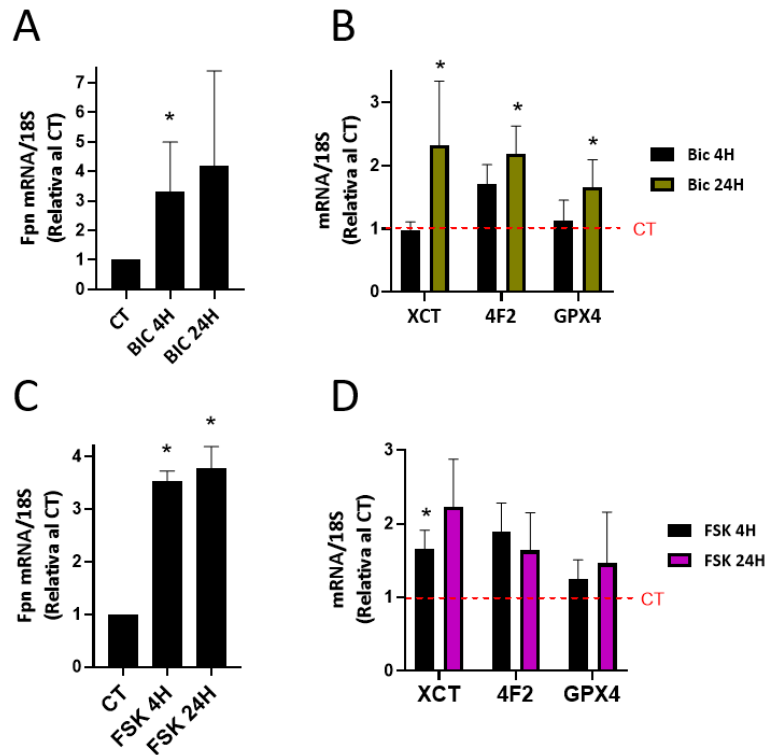


Figura 50: La actividad sináptica induce la expresión transcripcional de genes implicados en la defensa contra la ferroptosis. (A) Las neuronas se estimularon durante 4 o 24 h y la expresión del RNAm de Fpn se determinó mediante qPCR (n = 8 experimentos independientes). (B) Las neuronas se estimularon durante 4 o 24 h y la expresión del RNAm de los genes indicados se determinó mediante qPCR (n = 4–8 experimentos independientes). La línea discontinua roja indica los niveles de RNAm en neuronas en reposo. (C) Las neuronas se trataron con Forskolina (FSK, 10 μ M) durante 4 h y 24 h y la expresión del RNAm de Fpn se determinó mediante qPCR (n = 5 experimentos independientes). (D) Las neuronas se trataron con Forskolina (FSK, 10 μ M) durante 4 h y 24 h y la expresión de los genes indicados se determinó mediante qPCR (n = 3–4 experimentos independientes). La línea discontinua roja indica los niveles de RNAm en neuronas en reposo. Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo.

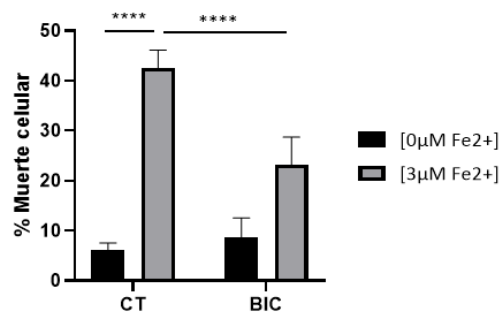


Figura 51: La actividad sináptica protege de la muerte celular por exceso de hierro. Gráfico de mortalidad celular en neuronas estimuladas durante 24 h y tratadas con hierro ferroso a 3 μ M. La mortalidad en el cultivo se determinó contando el número de núcleos picnóticos teñidos con DAPI (n = 4 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

2. La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial provoca alteraciones en el metabolismo del hierro.

En los complejos de la cadena de transporte de electrones el hierro es un componente esencial [373, 374]. El Complejo I mitocondrial contiene al menos 8 grupos de hierro-azufre y más de 25 átomos de hierro. Las deficiencias de grupos de hierro y azufre causan desequilibrios en los niveles de hierro [385] y, a diferencia del hierro unido a proteínas, el exceso de hierro lábil celular está relacionado con la generación de ROS, peroxidación lipídica, estrés oxidativo y ferroptosis [243]. La subunidad S4 de la ubiquinona oxidorreductasa mitocondrial (NDUF54) es una proteína con centros de grupo hierro-azufre (Fe-S) que forma parte del complejo I mitocondrial NADH Deshidrogenasa. Los ratones knockout para NDUF54 (NDUF54-KO) son un modelo del LS. Estos ratones presentan acumulación de hierro en varios tejidos, siendo la más drástica en el hígado [386]. Por lo tanto, en este apartado se estudió si alteraciones en el metabolismo del hierro podrían participar en la fisiopatología del LS.

2.1. La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial altera la expresión de genes implicados en el metabolismo del hierro.

Con el fin de estudiar el metabolismo del hierro en neuronas del tronco del encéfalo de ratones NDUF54-KO, se analizaron los cambios transcripcionales de diferentes genes implicados en el transporte del hierro en ratones NDUF54-KO antes de aparecer los síntomas clínicos (p20) y en ratones NDUF54-KO con sintomatología avanzada (p48). Como puede comprobarse en la Figura 52, en el modelo de ratón NDUF54-KO en una fase asintomática del SL, la falta de la subunidad mitocondrial NDUF54 conduce a un aumento en la expresión transcripcional del gen TFRC1 (Figura 52A). Mientras que, en el modelo de ratón NDUF54-KO en una fase sintomática del SL, se observa una disminución en la expresión transcripcional de MFRN1 y Fpn y, un aumento en la expresión de TFRC1 (Figura 52B). Estos resultados parecen indicar que la homeostasis del hierro está alterada en ratones NDUF54-KO, dirigida hacia un aumento de hierro en la célula.

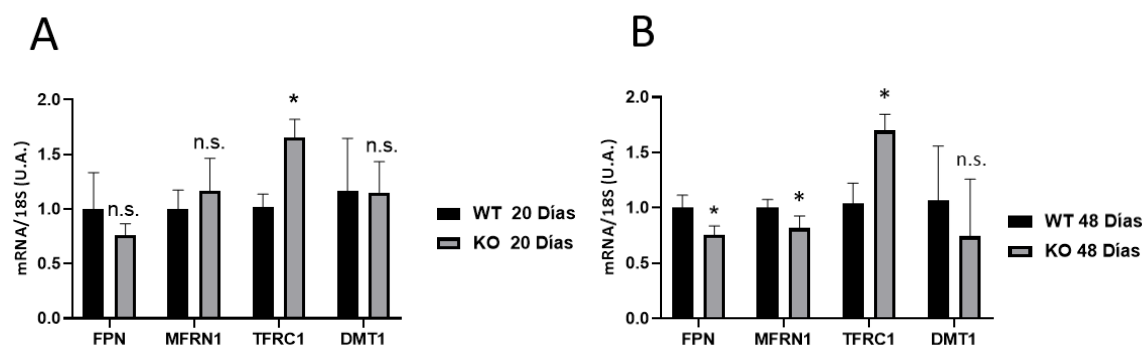


Figura 52: La falta de la subunidad NDUF54-KO del complejo I mitocondria altera la expresión transcripcional de genes implicados en el metabolismo del hierro. (A) Se determinó la expresión del RNAm de los genes indicados mediante qPCR de RNA extraído de tejido del tronco del encéfalo de ratones de 20 días y (B) de ratones de 48 días (n=3-6 ratones por condición WT y NDUF54-KO). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo.

2.2. La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial altera la expresión de proteínas clave en la homeostasis del hierro.

Alteraciones en la homeostasis del hierro a nivel cerebral, pueden provocar cambios patológicos graves en el SNC. Por ejemplo, la deficiencia de hierro puede ralentizar el desarrollo del sistema nervioso y causar trastornos del lenguaje y del movimiento [225], mientras que el exceso de hierro se ha visto relacionado con enfermedades neurodegenerativas [248-252]. Por lo tanto, para mantener la homeostasis celular el metabolismo del hierro está estrictamente regulado mediante moléculas reguladoras clave. A nivel traduccional las proteínas reguladoras de hierro IRP 1, también conocida como ACO1, y IRP2 actúan como sensores de hierro en las células y se unen al RNAm de proteínas involucradas en el metabolismo del hierro para controlar los niveles de hierro intracelular inhibiendo la traducción del RNAm o protegiendo el RNAm contra la degradación mediada por nucleasas [236]. No obstante, cuando la concentración de hierro en la célula es elevada ACO1 se convierte en una aconitasa citosólica incapaz de unirse a RNAm y IRP2 es degradada [25]. Se observó que la expresión proteica de ACO1 y IRP2 estaba disminuida en neuronas NDUF54-KO del tronco del encéfalo del modelo de ratón NDUF54-KO en una fase asintomática del LS (Figura 53A-C). Sin embargo, en ratones en la fase sintomática del LS no se observaron cambios (Figura 53D-G).

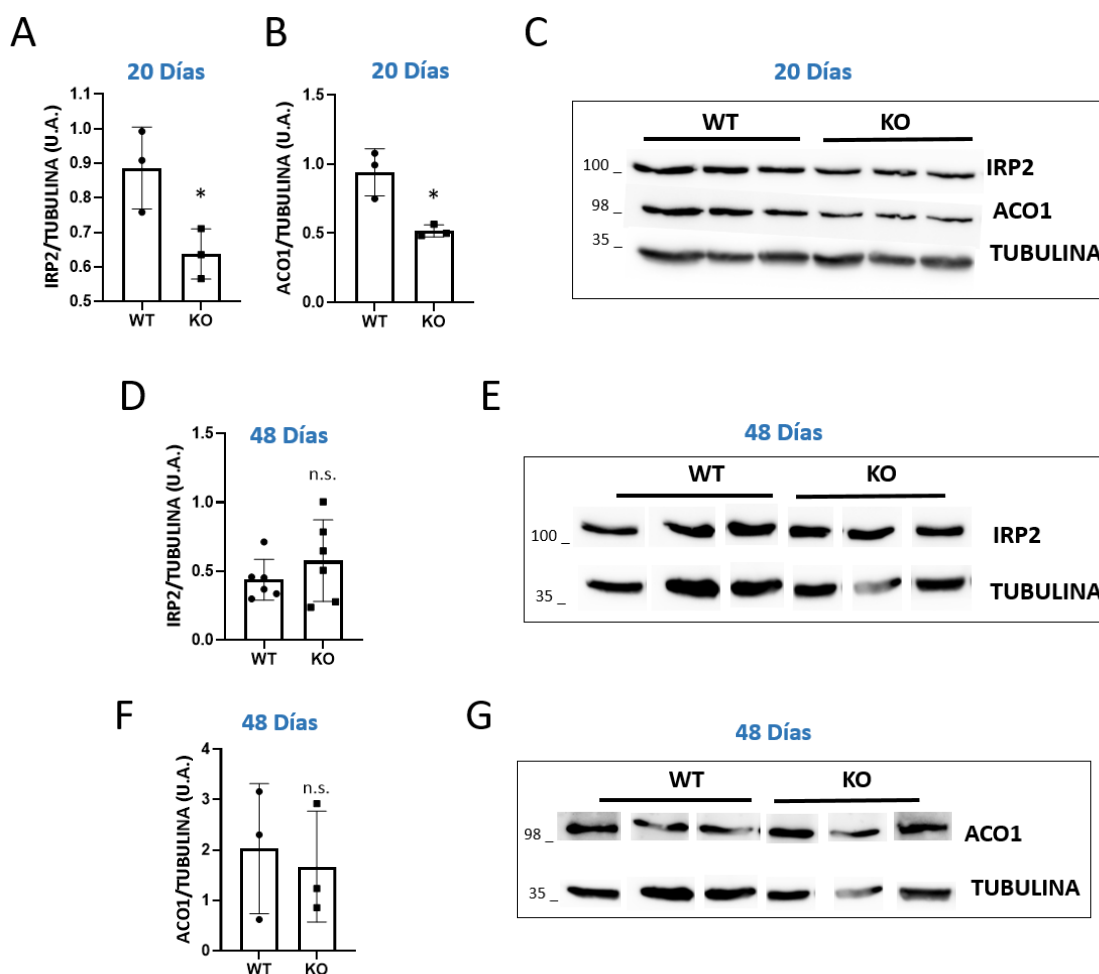


Figura 53: (A-B) Densitometría del Western blot de los extractos de proteína de neuronas WT y NDUF54-KO del tronco del encéfalo de ratones de 20 días (n=3 ratones por condición WT y NDUF54-KO). (C) Imágenes representativas del análisis por Western blot de ratones de 20 días. (D) Densitometría del Western blot del nivel de proteína de IRP2 de neuronas WT y NDUF54-KO del tronco del encéfalo de ratones de 48 días. (n=3-6 ratones por condición WT y NDUF54-KO). (E) Imágenes representativas del análisis. (F) Densitometría del Western blot del nivel de proteína de ACO1 de neuronas WT y NDUF54-KO del tronco del encéfalo de ratones de 48 días. (n=3-6 ratones por condición WT y NDUF54-KO). (G) Imágenes representativas del análisis. Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo.

2.3. La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial incrementa la peroxidación lipídica.

El hierro intracelular puede catalizar la formación del radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton [240]. Estos radicales hidroxilo pueden causar peroxidación lipídica en la membrana celular y conducir a la pérdida de su permeabilidad selectiva, lo que tiene consecuencias devastadoras, como la ferroptosis [240, 243]. Los ratones NDUF54-KO presentan estrés oxidativo, neuroinflamación y lesiones cerebrales [215]. TFRC1 es

un transportador de membrana que media la entrada del hierro a la célula [232]. Por lo tanto, dado que el gen del transportador de hierro intracelular TFRC1 estaba aumentado en ratones NDUFS4-KO, nos preguntamos si la alteración de la función mitocondrial podría provocar perturbaciones en la peroxidación lipídica y el contenido de hierro celular. Se observó que en el tronco del encéfalo del modelo de ratón NDUFS4-KO en una fase asintomática del LS la peroxidación lipídica estaba aumentada (Figura 54A), pero no pudimos determinar cambios en el contenido de hierro celular utilizando la técnica basada en ferrozina (Figura 54B). La peroxidación lipídica es un indicador de muerte por ferroptosis [243]. Por lo tanto, estos resultados pueden indicar que en el modelo de ratón NDUFS4-KO en una fase asintomática del LS empieza a producirse muerte celular por ferroptosis, sugiriendo que la alteración de la homeostasis del hierro puede contribuir a la patología del SL, acelerando así su progresión.

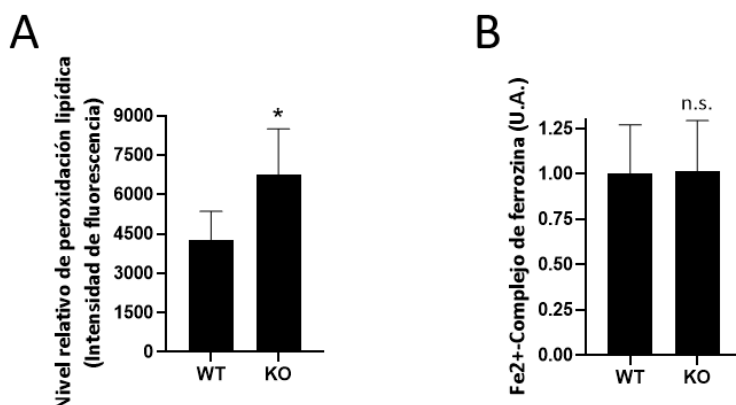


Figura 54: La falta de la subunidad NDUFS4-KO del complejo I mitocondria incrementa la peroxidación lipídica. (A) Contenido de peroxidación lipídica en tejido del tronco del encéfalo de ratones de 20 días utilizando el ensayo basado en TBA (n=3 ratones por condición WT y NDUFS4-KO). (B) Contenido de hierro ferroso en tejido del tronco del encéfalo de ratones de 20 días utilizando el ensayo basado en ferrozina (n=3 ratones por condición WT y NDUFS4-KO). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo.

2.4. La falta de la subunidad NDUFS4 del complejo I mitocondrial reduce la expresión de genes implicados en la defensa contra la ferroptosis.

La célula tiene un mecanismo para regular la cantidad de radicales de hidroxilo en la célula, mediante el programa de defensa contra la ferroptosis, formado por el sistema Xc-antiportador de cisteína-glutamato y la proteína GPX4, encargada de la síntesis de glutatión [246]. GPX4, al reducir los hidroperóxidos, protege a la célula del daño oxidativo generado por la peroxidación lipídica [243, 387, 388].

Por lo tanto, con el fin de determinar el mecanismo mediante el cual aumenta la peroxidación lipídica en ratones NDUFS4-KO se analizó la defensa redox, en primer lugar, se estudió el programa de defensa contra la ferroptosis y, para ello se midió la expresión transcripcional de los genes implicados en el sistema Xc-antiportador de cisteína-glutamato y la síntesis de glutatión. Se observó que en el modelo de ratón NDUFS4-KO en una fase sintomática del LS la expresión transcripcional de GPX4 y XCT estaba disminuida en el tronco del encéfalo (Figura 55) lo cual puede llevar a un desequilibrio en de la defensa redox.

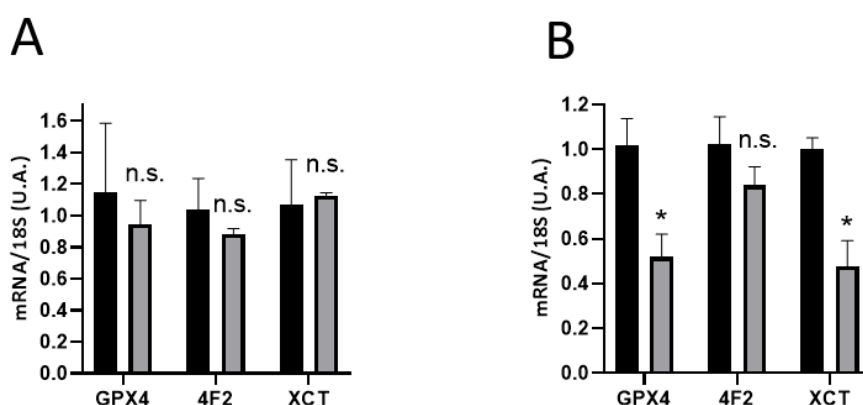


Figura 55: La falta de la subunidad NDUFS4-KO del complejo I mitocondrial disminuye la expresión transcripcional de genes implicados en la defensa contra la ferroptosis. Se determinó la expresión del RNAm de los genes indicados mediante qPCR de RNA extraído de tejido del tronco del encéfalo (n=3 ratones por condición WT y NDUFS4-KO) de ratones de 20 días y (B) de ratones de 48 días (n=3 ratones por condición WT y NDUFS4-KO). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo.

3. Regulación de la SRM por el CBD en neuronas NDUFS4-KO.

El modelo de ratón NDUFS4-KO presenta alteraciones en la función mitocondrial y muestra fenotipos similares a los de los pacientes con LS, una patología mitocondrial englobada dentro de las EM [215, 217, 389, 390]. Las EM presentan inespecificidad de tejido, por lo que pueden afectar a cualquier órgano, no obstante, no afectan a todos los órganos por igual. En las EM las características clínicas son heterogéneas y las afectaciones multisistémicas, mostrando fenotipos muy diferentes con una fisiopatología muy diversa [185, 186]. Por lo tanto, la fisiopatología de las EM no puede ser debida únicamente a un déficit energético, sino que deben participar otros eventos como desequilibrios en la SRM [17, 96, 391]. Nuestros colaboradores del laboratorio del

Dr. Albert Quintana (UAB) han observado que la administración diaria de CBD en ratones con síndrome de Leigh extiende significativamente la vida útil y mejora la patología. Por lo tanto, en este apartado nos centramos en estudiar como protege el CBD en el modelo animal de LS NDUF54-KO, con el objetivo de identificar nuevas dianas en el LS y crear oportunidades terapéuticas más específicas.

3.1. El CBD no modifica la bioenergética mitocondrial en neuronas NDUF54-KO.

La disfunción mitocondrial observada en las EM puede activar cascadas de señalización retrograda con el objetivo de desencadenar respuestas celulares adaptativas en el que las mitocondrias envían señales al núcleo, no obstante, si la disfunción mitocondrial persiste este mecanismo puede desencadenar en muerte celular [17, 96]. Los ratones NDUF54 presentan una despolarización parcial de la membrana mitocondrial, un aumento en los niveles de ROS y de NADPH y, alteraciones en los niveles de calcio y ATP [392-394]. Con el objetivo de determinar sobre que vías actúa el CBD, se pretendió estudiar el efecto del CBD sobre diferentes vías de la SRM activas en cultivos primarios de neuronas NDUF54-KO del tronco del encéfalo y del cerebelo. Se determinó el MMP mediante la sonda fluorescente TMRM, la cual es captada hacia la mitocondria de manera dependiente del MMP. Se observó que, al comparar neuronas WT con neuronas KO para NDUF54, las neuronas NDUF54-KO presentaron una menor señal de fluorescencia de la sonda y, por tanto, una disminución del MMP, indicando defectos en la bioenergética mitocondrial. No obstante, el tratamiento con CBD no fue capaz de recuperar el MMP reducido en neuronas NDUF54-KO (Figura 56A). A continuación, se midieron los niveles de NAD⁺/NADH y los niveles de ATP intracelular mediante el kit comercial NAD⁺/NADH Glo Assay de Promega y ATPlite Luminescence Assay System de PerkinElmer, respectivamente. Tal como se observa en la figura 56 el CBD tampoco recupero los valores disminuidos de ATP y NAD⁺ en neuronas NDUF54-KO (Figura 56B, C). Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que el CBD no es capaz de regular la bioenergética mitocondrial.

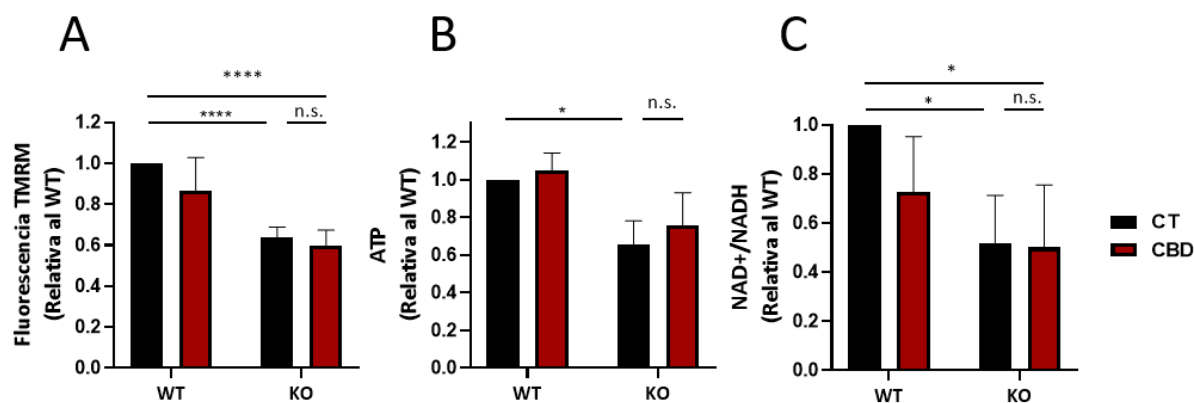


Figura 56: El CBD no normaliza la bioenergética mitocondrial alterada en neuronas con el complejo mitocondrial I alterado. (A) MMP determinado mediante la fluorescencia de TMRM (6nM) en neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con CBD (1 μ M) (n = 7 experimentos independientes). (B) Niveles ATP en neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del cerebelo y tratadas o no con CBD (1 μ M) (n = 4 experimentos independientes). (C) Niveles de NAD⁺/NADH total en neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del cerebelo y tratadas o no con CBD (1 μ M) (n = 5 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * p < 0,05, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

3.2. El CBD no altera los niveles de calcio mitocondrial en neuronas NDUF54-KO.

El calcio intracelular regula un amplio espectro de procesos biológicos [395]. En las mitocondrias el calcio regula encimas del ciclo de Krebs y la piruvato deshidrogenasa (PDH), por lo que es esencial para mantener la bioenergética mitocondrial [396, 397]. Además, la mitocondria regula los niveles de calcio citoplasmático permitiendo su entrada cuando su concentración citoplasmática es elevada o liberándolo cuando es necesario [398]. Alteraciones en la homeostasis del calcio pueden desencadenar la muerte celular por apoptosis [54]. Se ha visto que el CBD regula la homeostasis del Ca²⁺ en condiciones patológicas que implican disfunción mitocondrial y desregulación del Ca²⁺ [399]. Las proteínas receptoras de cannabinoides están presentes no sólo en las membranas neuronales, sino también en las membranas mitocondriales (mtCB1) y, su estimulación promueve la transferencia de calcio desde el retículo endoplásmico a las mitocondrias [400]. Por esta razón se propone que el CBD puede resultar beneficioso al regular la homeostasis del Ca²⁺ para prevenir la señalización apoptótica mediante la restauración de la homeostasis del Ca²⁺. Se analizó el Ca²⁺ mitocondrial en cultivos primarios de tronco del encéfalo tras desacoplar las mitocondrias con CCCP y medir el

Ca²⁺ citoplasmático mediante la sonda fluorescente Fluo-4 y, se observó un menor aumento en los niveles de Ca²⁺ citoplasmático (Figura 57), provocado por una menor cantidad de Ca²⁺ liberado desde las mitocondrias de células NDUFS4-KO, no obstante, el CBD no fue capaz de recuperar sus valores (Figura 57).

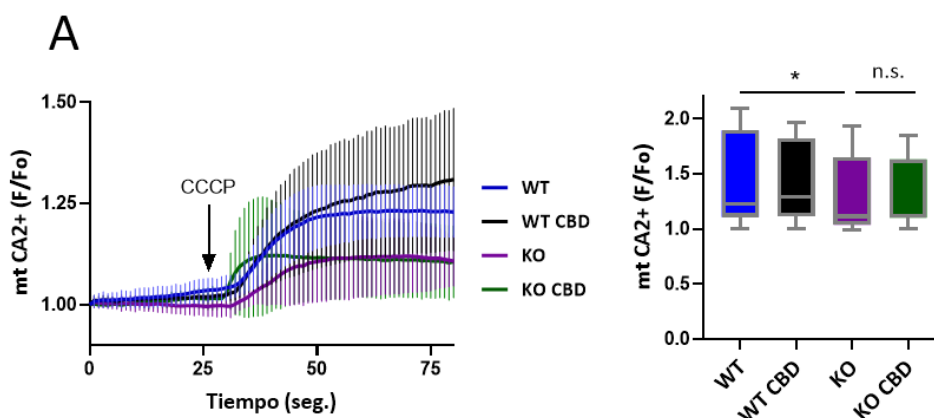


Figura 57: El CBD no recupera el Ca²⁺ mitocondrial alterado en neuronas NDUFS4-KO. Determinación del calcio mitocondrial mediante la sonda Fluo-4 (2 μ M) en neuronas WT y NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con CBD (1 μ M). El Ca²⁺ mitocondrial fue liberado de las mitocondrias aplicando CCCP (10 μ M) y se monitorizó el incremento en el Ca²⁺ citoplasmático (n = 4 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * p < 0,05, prueba de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples Dunn's. n.s. = no significativo.

3.3. El CBD disminuye el flujo glucolítico en neuronas NDUFS4-KO.

En el LS se observa hiperlacticoacidemia, provocada por un exceso de lactato en el medio extracelular que contribuye a la fisiopatología del LS [197, 204, 205]. Durante la glucólisis se genera el piruvato como producto final y este, además de ser oxidado en las mitocondrias, también puede ser reducido a lactato por la LDH en el citoplasma de la célula, regenerando el NAD⁺ consumido por la glucólisis [289]. De acuerdo con esto y con el objetivo de determinar sobre qué vías actúa el CBD se pretendió estudiar el efecto del CBD sobre los niveles de lactato extracelular de nuestros cultivos primarios de neuronas. Para ello se les cambió el medio 24 horas antes del experimento por uno con una concentración fisiológica de glucosa de 2.4 mM [401]. En análisis mostró que, tal como se ha descrito, las neuronas NDUFS4-KO produjeron más lactato que las WT, tanto en neuronas del tronco del encéfalo como en neuronas del cerebelo, y este aumento fue bloqueado por el CBD (Figura 58A y 58B). Por lo tanto, el CBD es capaz de regular el flujo glucolítico en cultivos NDUFS4-KO.

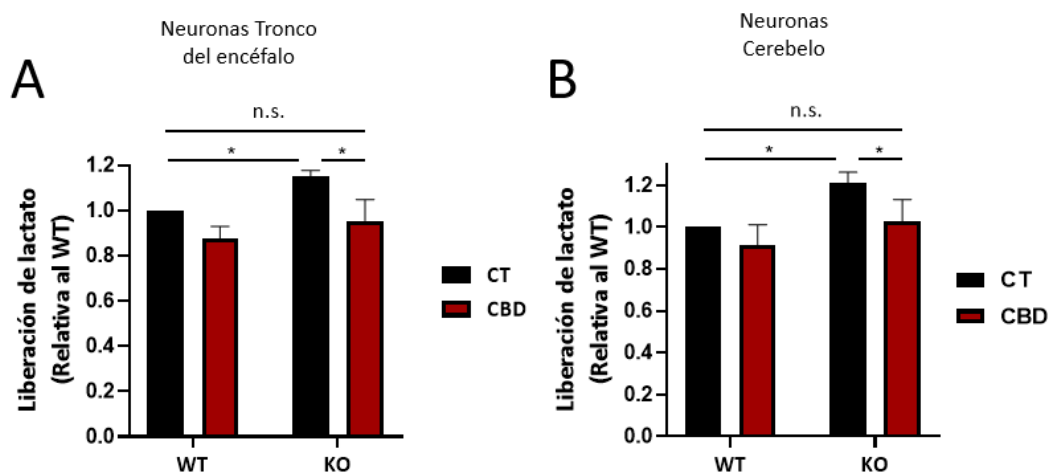


Figura 58: El CBD disminuye el flujo glucolítico en neuronas NDUF54-KO. (A) Lactato liberado al medio de neuronas WT y NDUF54-KO tratadas o no con CBD (1 μM) cultivadas del tronco del encéfalo (n=3 experimentos independientes) y (B) del cerebelo (n=4 experimentos independientes). Los valores representan la media ± e.e.m. * p < 0,05, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

4. Neuronas NDUF54-KO estimulan el flujo glucolítico.

4.1. La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial incrementa la liberación de lactato.

El lactato participa en la patología del LS [197, 204, 205]. Por lo tanto, dado que nuestros resultados revelaron que el CBD disminuye el flujo glucolítico de neuronas NDUF54-KO cultivadas, decidimos estudiar con más detalle el metabolismo de la glucosa. Para determinar si el incremento de lactato en el medio es específico de células neuronales (Figura 58A y B y Figura 59A y B), se midieron los niveles de lactato en el medio de diferentes células cultivadas. Se analizaron los niveles de lactato en el medio de células gliales del córtex cerebral (astrocitos y microglía) y se observó que únicamente la microglía NDUF54-KO cultivada aumentaba la liberación de lactato (Figura 59C y D).

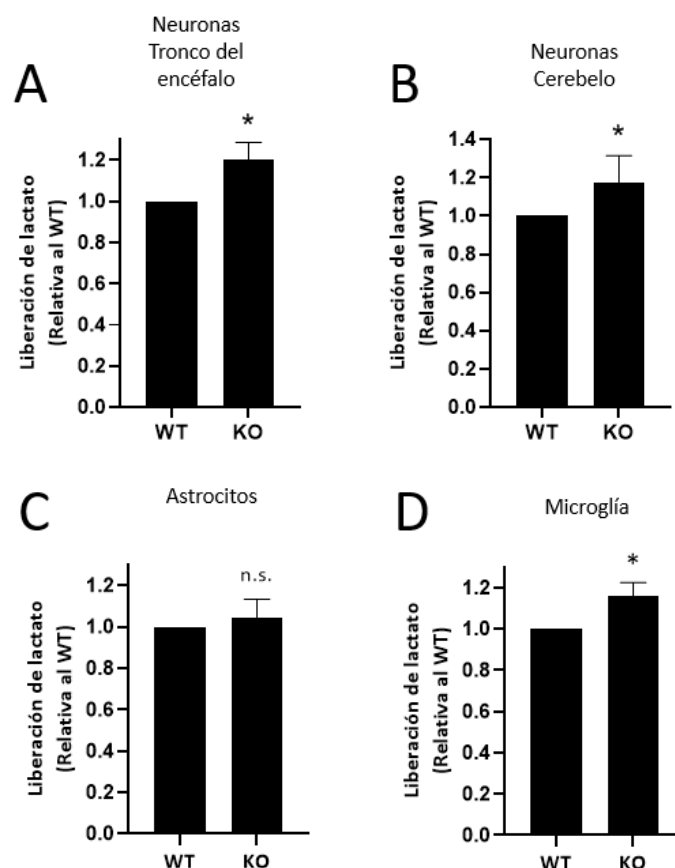


Figura 59: Neuronas NDUF54-KO estimulan/incrementan el flujo glucolítico. (A) Lactato liberado al medio de neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo (n=5 experimentos independientes) y (B) del cerebelo (n=10 experimentos independientes) y, (C) de astroцитos (n=3 experimentos independientes) y (D) microglía (n=4 experimentos independientes) WT y NDUF54-KO cultivados del córtex cerebral. Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo.

4.2. Neuronas NDUF54-KO promueven la captación de glucosa.

La glucosa es la principal fuente de energía del SNC y, con el fin de producir energía para la célula, es metabolizada principalmente en la vía glucolítica [258, 275] para producir piruvato que alimentará el ciclo de Krebs y el sistema OXPHOS mitocondrial [402]. Se ha visto que alteraciones en la función mitocondrial conducen a un aumento en la glucólisis y el consumo de glucosa [403]. Por lo que nos preguntamos si las neuronas NDUF54-KO con el metabolismo mitocondrial alterado también presentan alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Para ello se midió la captación de glucosa de neuronas cultivadas, mediante el análogo fluorescente de la glucosa 2-NBDG y, se observó que neuronas NDUF54-KO emitían un mayor nivel de fluorescencia que las neuronas WT cultivadas, indicando un aumento en la captación de glucosa (Figura 60A y B). Lo que

parece indicar que en las neuronas NDUFS4-KO el mayor transporte de glucosa contribuye al aumento en la producción de lactato, probablemente a través de la glucólisis.

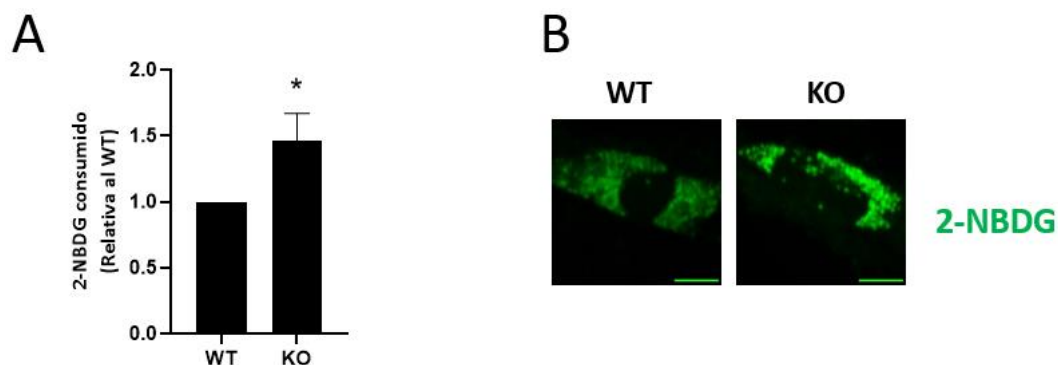


Figura 60: Neuronas NDUFS4-KO promueven la captación de glucosa. (A) Captación de 2-NBDG en neuronas cultivadas WT y NDUFS4-KO del tronco del encéfalo (n=4 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo. (E) Imágenes representativas de la captación de 2-NBDG. Barra de escala: 10 μ m.

4.3. Ratones NDUFS4-KO presentan niveles elevados de HIF-1a.

Se ha demostrado que, el factor de transcripción caracterizado por regular la respuesta adaptativa a hipoxia, HIF-1 es un factor clave en la regulación del metabolismo de la glucosa, puede activar la glucólisis y media la transición de un metabolismo oxidativo a uno glucolítico promoviendo la expresión de diferentes genes implicados en el metabolismo glucolítico. Promueve la expresión de transportadores de la glucosa como GLUT1 y GLUT3 y, activa la expresión de enzimas como HKII, PFK1, PKM y PFKFB1-4 [404, 405].

En condiciones hipóxicas, HIF-1 inhibe la conversión de piruvato en acetil coenzima A para su entrada en el ciclo del Krebs mediante la regulación de PDK1 [147, 148]. La LDHA y MCT4 también se han visto inducidos por HIF1 [406, 407], por lo que, dado que la falta de la subunidad mitocondrial NDUFS4 estimula el flujo glucolítico. Se comprobó la expresión de HIF-1a en tejido del tronco del encéfalo. Se observó un aumento en los niveles de expresión proteica en el modelo de ratón NDUFS4-KO en una fase asintomática del LS (Figura 61A y B). No obstante, en el modelo de ratón NDUFS4-KO en la fase sintomática del LS este aumento en la expresión no se mantiene (Figura 61C y D).

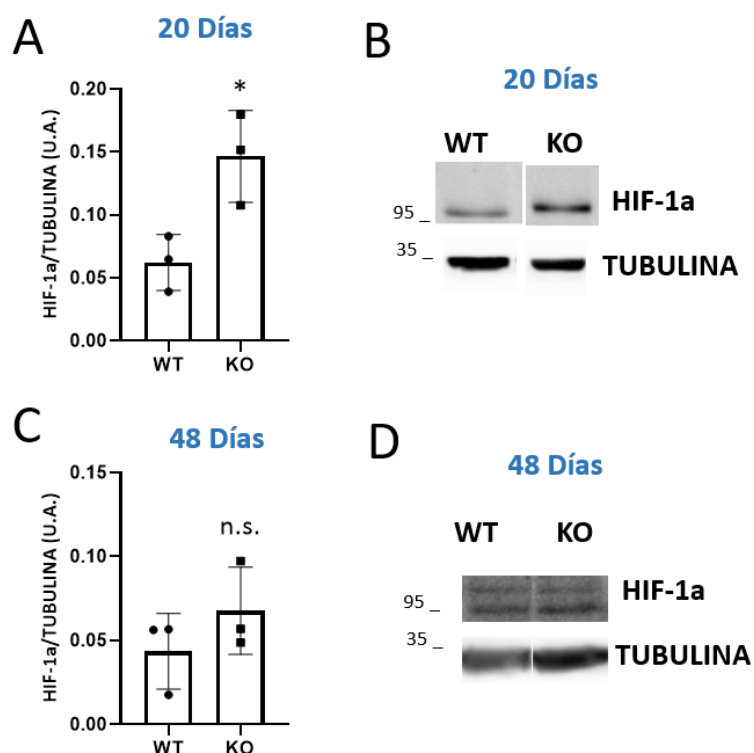


Figura 61: Ratones NDUFS4-KO estimulan la expresión de HIF-1a. (A) Se analizaron los niveles de Hif-1a por densitometría de las bandas del Western blot de extractos de proteína del tronco del encéfalo de ratones de 20 días (n=3 ratones por condición WT y NDUFS4-KO) y (C) 48 días (n=3 ratones por condición WT y NDUFS4-KO). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo. (B) Imágenes representativas de western blot de ratones de 20 días y (D) 48 días.

4.4. Neuronas NDUFS4-KO estimulan la expresión de genes implicados en el transporte y el metabolismo de la glucosa.

La glucólisis es la principal fuente de lactato en la célula [408]. Por lo que, la liberación de lactato al medio ha sido comúnmente utilizada como una representación de la actividad glucolítica [409]. Así que nos preguntamos si el incremento en la liberación de lactato y el aumento en la captación de glucosa en neuronas NDUFS4-KO se asociaba a un cambio a nivel transcripcional de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa. Para ello se midió por qPCR la expresión transcripcional del transportador de glucosa GLUT3, y las enzimas limitantes de la glucólisis HKII, PKM y PFKFB3. Como resultado se observó que en neuronas NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo había un incremento en los niveles de expresión de todos los genes (Figura 62A). Por lo tanto, se decidieron estudiar también los cambios transcripcionales inducidos por la falta de la subunidad NDUFS4 en tejido del tronco del encéfalo de ratones NDUFS4-KO. En el

modelo de ratón NDUFS4-KO en una fase asintomática del se observó un aumento en los niveles de expresión de GLUT3 únicamente (Figura 62B). Sin embargo, en el modelo de ratón NDUFS4-KO en la fase sintomática del LS se observó un aumento en los niveles de expresión de PKM (Figura 62C) sin diferencias significativas en la expresión transcripcional de GLUT3, HKII y PFKB3.

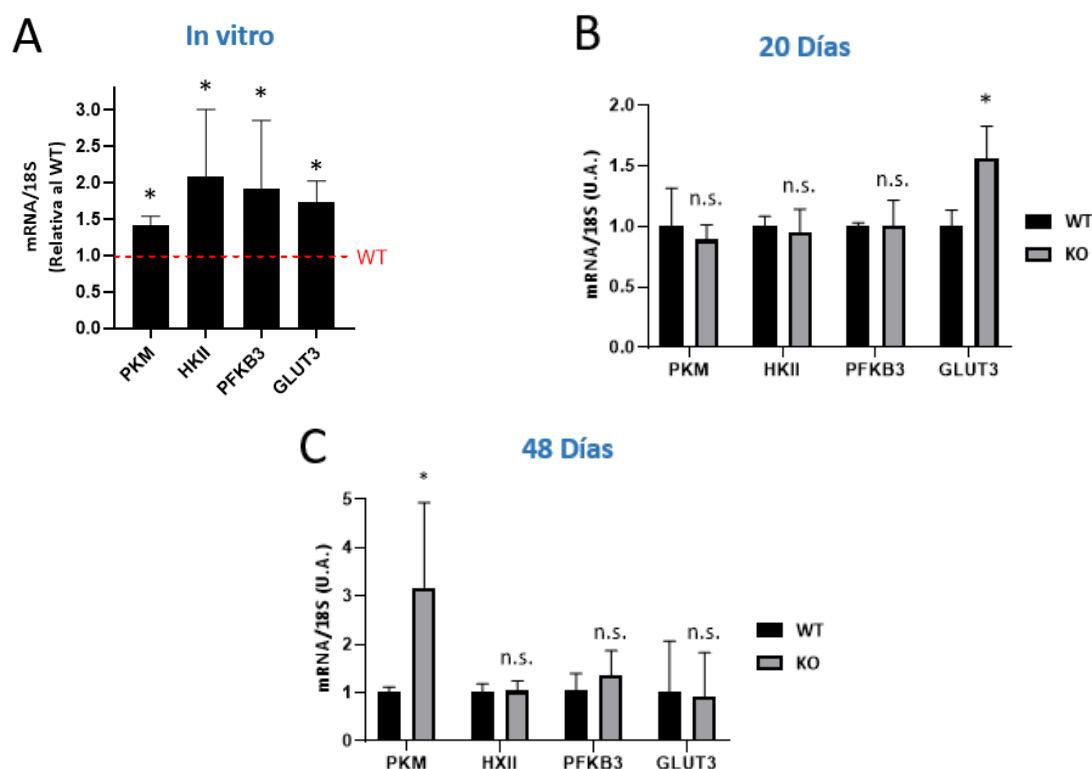


Figura 62: Neuronas NDUFS4-KO estimulan la expresión de genes implicados en el transporte y el metabolismo de la glucosa. (A) Análisis en la expresión del RNAm de los genes indicados mediante qPCR en neuronas WT y NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo (n = 6 experimentos independientes). La línea discontinua roja indica los niveles de RNAm en neuronas WT. (B) Se determinó la expresión del RNAm de los genes indicados mediante qPCR de RNA extraído de tejido del tronco del encéfalo de ratones de 20 días y (C) de ratones de 48 días (n=3 ratones por condición WT y NDUFS4-KO). La línea discontinua roja indica los niveles de RNAm en neuronas WT. Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo.

4.5. La falta de la subunidad NDUFS4 del complejo I mitocondrial estimula la expresión de genes implicados en el metabolismo del lactato.

El aumento en la expresión transcripcional de genes implicados en el transporte y el metabolismo de la glucosa en neuronas NDUFS4-KO sugiere que estas células utilizan más la vía glucolítica para obtener energía. Por lo tanto, todo parece indicar que el incremento de lactato observado en neuronas NDUFS4-KO es debido a un aumento en

la reducción del piruvato, producto final de la glucólisis, a lactato para obtener NAD⁺ y así mantener el flujo glucolítico. La enzima encargada de metabolizar esta reacción es la LDH. La conversión de piruvato a lactato esta favorecida por la LDHA, mientras que la LDHB tiene una mayor afinidad por el lactato, convirtiendo preferentemente lactato en piruvato [308, 309]. Para investigar con más detalle la capacidad de las células NDUFS4-KO de producir lactato, se analizó la expresión de los genes implicados en el metabolismo y el transporte del lactato. Se observó un aumento del ratio LDHA/LDHB a nivel transcripcional en de neuronas NDUFS4-KO del tronco del encéfalo (Figura 63A) sin cambios en su expresión transcripcional in vivo (Figura 63B-C). Y, un aumento del ratio LDHA/LDHB en los niveles de proteína in vitro (Figura 63D) e in vivo (Figura 63E-F).

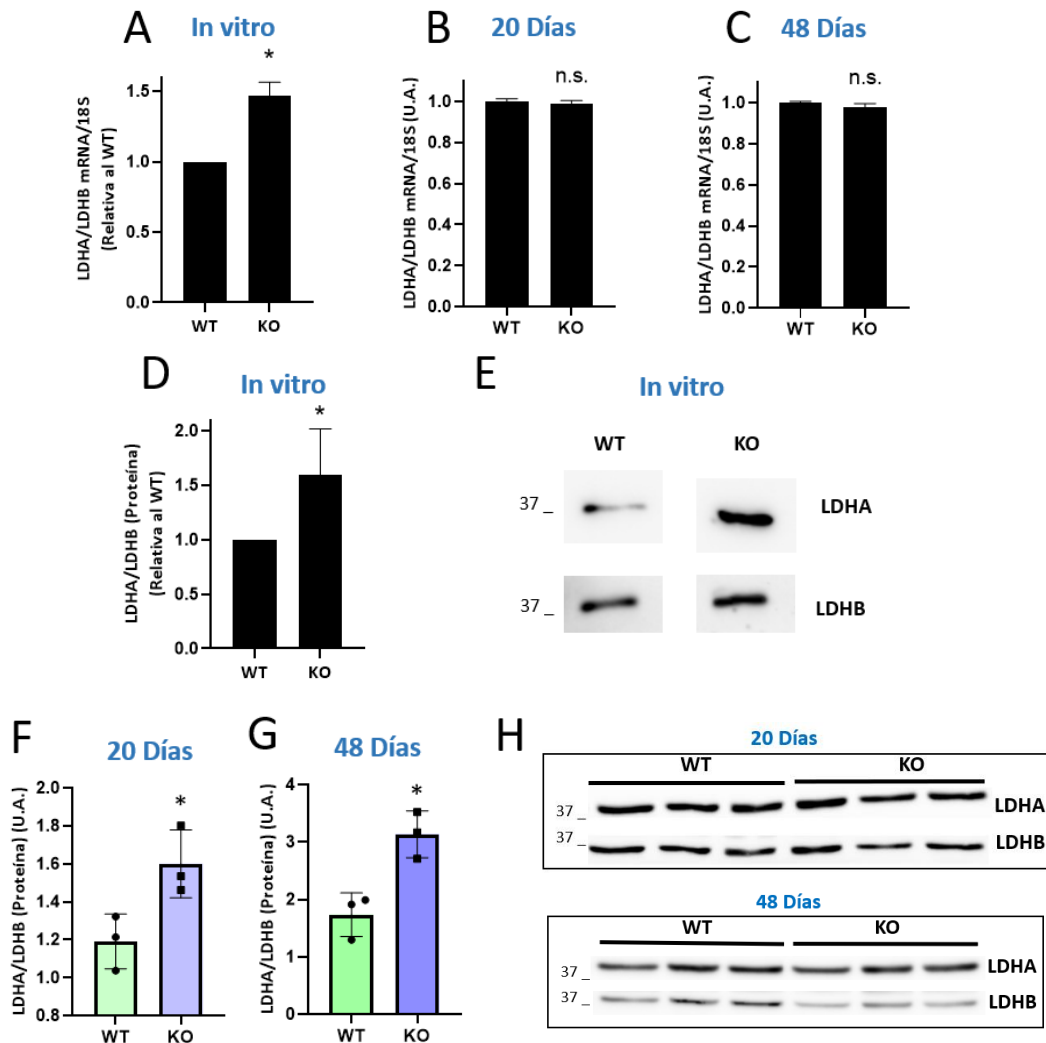


Figura 63: La falta de la subunidad NDUFS4 del complejo I mitocondrial estimula la expresión de genes implicados en el metabolismo del lactato. (A) Análisis en la expresión del RNAm del ratio LDHA/LDHB mediante qPCR en neuronas WT y NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo (n = 3 experimentos independientes). (B) Análisis en la expresión del RNAm del ratio LDHA/LDHB mediante qPCR de RNA extraído de tejido del tronco del encéfalo de ratones de 20 y (C) 48 días (n=3 ratones por condición WT y

NDUFS4-KO). (D) Densitometría del Western blot del ratio LDHA/LDHB en neuronas WT y NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo (n = 5 experimentos independientes). (E) Imágenes representativas de western blot de neuronas del tronco del encéfalo. (F) Densitometría del Western blot del ratio LDHA/LDHB de los extractos de proteína de neuronas WT y NDUFS4-KO del tronco del encéfalo de ratones de 20 y (G) 48 días (n=3 ratones por condición WT y NDUFS4-KO). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo. (H) Imágenes representativas de western blot de ratones de 20 días y (D) 48 días.

4.6. La falta de la subunidad NDUFS4 del complejo I mitocondrial promueve la formación de isoenzimas implicadas en la síntesis de lactato.

La LDH funcional está formada por homo-heterotetrameros de las subunidades LDHA y LDHB. De modo que se pueden formar cinco isoenzimas diferentes: LDH1 (formada por 4 homotetrameros de LDHB), LDH2 (formada por 3 subunidades LDHB y 1 subunidad LDHA), LDH3 (formada por 2 subunidades LDHB y 2 subunidades LDHA), LDH4 (formada por 1 subunidad LDHB y 3 subunidades LDHA) y, LDH5 (formada por 4 homotetrameros de LDHA) [309]. La relación LDHA: LDHB refleja las tasas metabólicas y necesidades energéticas de la célula, las cuales en función del tejido celular son diferentes. La mayor parte del lactato en circulación, alrededor del 40%, es liberado por el músculo esquelético [410]. El músculo esquelético utiliza la vía glucolítica para obtener energía por lo que, predominantemente, el piruvato obtenido de esta vía es reducido a lactato mediante la LDHA. Mientras que el corazón utiliza la oxidación mitocondrial del piruvato para obtener energía por lo que la LDHB está más expresada en este tejido para producir más piruvato [411]. En el cerebro, en cambio, esta tasa metabólica responde dinámicamente a los cambios en las concentraciones de glucosa y lactato en sangre [261]. Para estudiar la expresión de las diferentes isoenzimas de la LDH se llevó a cabo una técnica electroforética sin agentes reductores, conocida como zimografía o zimograma [412]. Como se observa en la Figura 64 el tejido muscular de ratón presenta una mayor expresión de la isoenzima LDH5, mientras que el tejido cardíaco presenta mayor expresión de las isoenzimas LDH1, LDH2 y LDH3. Por el contrario, en tejido del tronco del encéfalo LDH1 es la isoenzima que mayor expresión presenta, con una disminución progresiva en las isoenzimas que disminuyen la cantidad de subunidades B en su tetrámero.

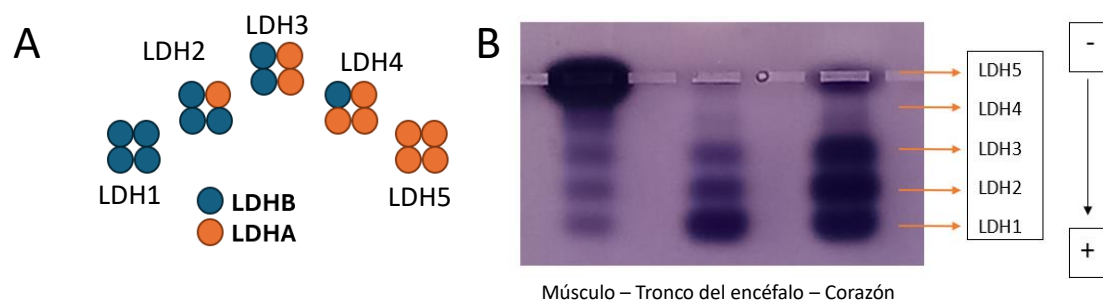


Figura 64: Estructura de LDH y sus zimogramas. (A) Diagrama de las cinco isoenzimas de lactato deshidrogenasa según sus diferentes patrones de composición con las dos subunidades LDHA y LDHB. (B) Imagen del zimograma de la expresión de las diferentes isoenzimas de la LDH en diferentes tejidos de ratón (corazón, tronco del encéfalo y músculo).

Se estudio la expresión de las diferentes isoenzimas en tejido cerebral del modelo de ratón *NDUFS4-KO* en una fase asintomática y sintomática del LS y, se observó una disminución del 5% en la expresión de la isoenzima LDH1 y un aumento del 5% en la isoenzima LDH4 en ambas fases del LS, sin cambios en la expresión de las isoenzimas LDH2 Y LDH3 (Figura 65). Además, se observó que la expresión de la isoenzima LDH1 (4B) aumenta con el tiempo en el tejido del tronco encefálico de ratones WT y *NDUFS4-KO* (Figura 66).

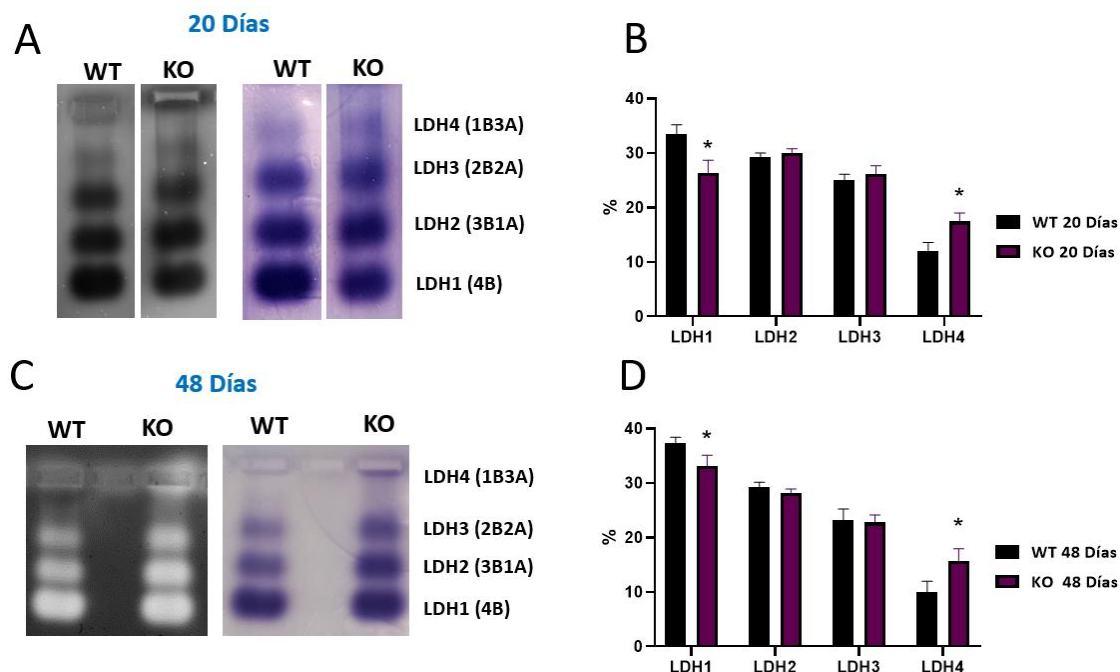


Figura 65: La falta de la subunidad *NDUFS4* del complejo I mitocondrial promueve la formación de isoenzimas implicadas en la síntesis de lactato. (A) Imagen del zimograma de LDH y (B) análisis de la expresión isoenzimática de la LDH en tejido del tronco del encéfalo de ratones de 20 días (n=3 ratones por condición WT y *NDUFS4-KO*). (C) Imagen del zimograma de LDH y (D) análisis de la expresión isoenzimática de la LDH en tejido del tronco del encéfalo de ratones de 48 días (n=3 ratones por condición WT y *NDUFS4-KO*).

KO). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo.

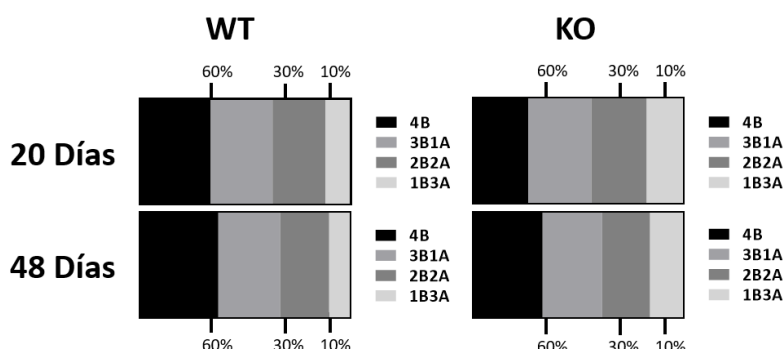


Figura 66: Porcentaje en la expresión de las diferentes isoenzimas de LDH en tejido del tronco del encéfalo de ratones de 20 días y 48 días (n=3 ratones por condición WT y NDUFS4-KO).

4.7. La falta de la subunidad NDUFS4 del complejo I mitocondrial estimula la expresión de genes implicados en el transporte del lactato.

El lactato reducido mediante la enzima lactato deshidrogenasa debe exportarse fuera de la célula para que continúe la glucólisis [303]. Este producto es transportado a través de la BBB y la membrana celular mediante los transportadores MCT1, MCT2 y MCT4 [298], siendo MCT1 y MCT4 predominantes en células astrogliales y MCT2 la isoforma principal en las neuronas [304]. El transportador MCT2 tiene mayor afinidad por captar el lactato, aunque también es capaz de promover la liberación de lactato al medio [270].

Los datos anteriores sugieren que el metabolismo del lactato está alterado, por lo tanto, para determinar los cambios transcripcionales asociados a la falta de la subunidad NDUFS4, analizamos los niveles de RNAm de diferentes genes implicados en el transporte del lactato. No obstante, el transportador neuronal de lactato MCT2 no cambió su expresión transcripcional en neuronas cultivadas NDUFS4-KO del tronco del encéfalo (Figura 67A). Se observó que el patrón de expresión de los transportadores de lactato era diferente entre ratones NDUFS4-KO en una fase asintomática y sintomática. Con un aumento en la expresión transcripcional del transportador MCT1 de células astrogliales y MCT2 de neuronas en ratones del modelo de ratón NDUFS4-KO en una fase asintomática del LS (Figura 67B) y, una disminución en la expresión transcripcional del transportador MCT1 y MCT4 de células astrogliales y MCT2 de neuronas del modelo de ratón NDUFS4-KO en una fase sintomática del LS (Figura 67C).

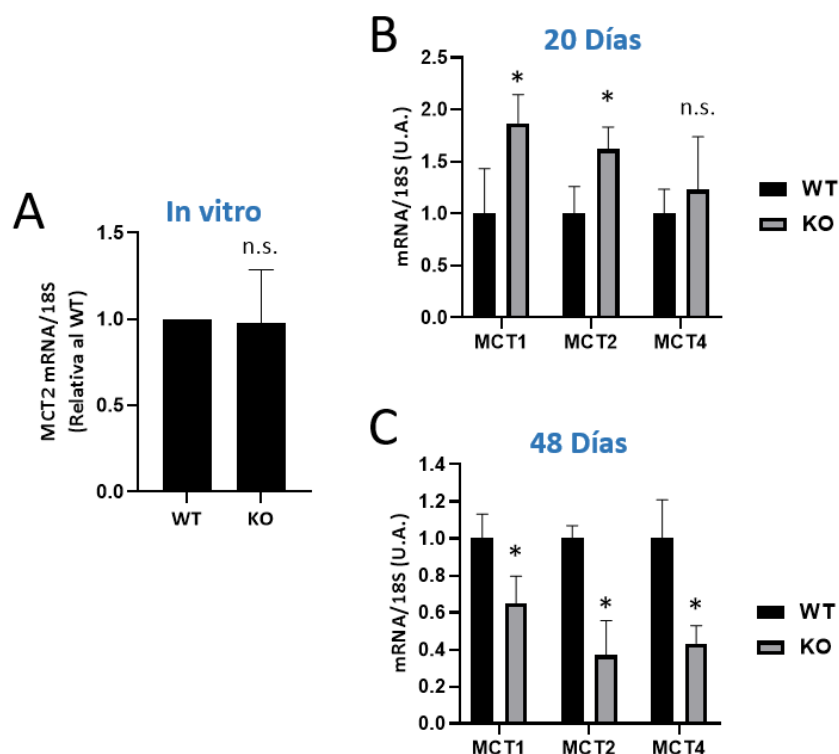


Figura 67: La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial estimula la expresión de genes implicados en el transporte del lactato. (A) Análisis en la expresión del RNAm del ratio LDHA/LDHB mediante qPCR en neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo (n = 3 experimentos independientes). (B) Análisis en la expresión del RNAm de los genes indicados mediante qPCR de RNA extraído de tejido del tronco del encéfalo de ratones de 20 días (n=3 ratones por condición WT y NDUF54-KO) (C) y de 48 días (n=3 ratones por condición WT y NDUF54-KO). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo.

4.8. La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial provoca modificaciones postraduccionales asociadas al aumento de la glucólisis.

El lactato sirve como una molécula de bioseñalización multifuncional, además de ser un metabolito clave que conecta la glucólisis y la fosforilación oxidativa [318]. Desempeña un papel importante en las respuestas inmunitarias, la formación de la memoria y la cicatrización de heridas [307]. Sin embargo, el exceso de lactato generado por la glucólisis se relaciona con acidosis láctica y lactilación, presentes en algunas enfermedades neurodegenerativas [307, 310, 313, 322, 323]. El ácido láctico disminuye el pH extracelular y puede provocar la acidificación de los tejidos, disminuyendo su actividad metabólica [307]. La patología del síndrome de Leigh se caracteriza, entre otras características, por acidosis láctica con hiperlacticoacidemia en sangre y/o líquido

cefalorraquídeo [195, 322]. Además, la lactilación también se ha visto implicada en los mecanismos de múltiples enfermedades [322]. El aumento de lactato en la célula media la modificación postraducciona de histonas por lactilación, la cual tiene un papel fundamental en la regulación inmune y el mantenimiento de la homeostasis celular [310]. Y, este aumento en la lactilación de histonas se ha relacionado el aumento de LDHA [310, 413]. Dado que la falta de NDUFS4 provoca un aumento en LDHA y lactato, se analizaron los niveles de lactilación de la histona 3 por western blot. Se observó un aumento en la lactilación de neuronas NDUFS4-KO de cultivos primarios del tronco del encéfalo (Figura 68A y B), del cerebelo (Figura 68C y D) y de microglía del córtex cerebral (Figura 68E). Sin embargo, en astrocitos NDUFS4-KO del córtex cerebral cultivados no se observaron diferencias en los niveles de lactilación (Figura 68F). El aumento de lactilación observado in vitro se corroboró con experimentos in vivo, en el que se observó también un aumento en la lactilación de tejido del tronco del encéfalo del modelo de ratón NDUFS4-KO en una fase sintomática del LS (Figura 69 A y B).

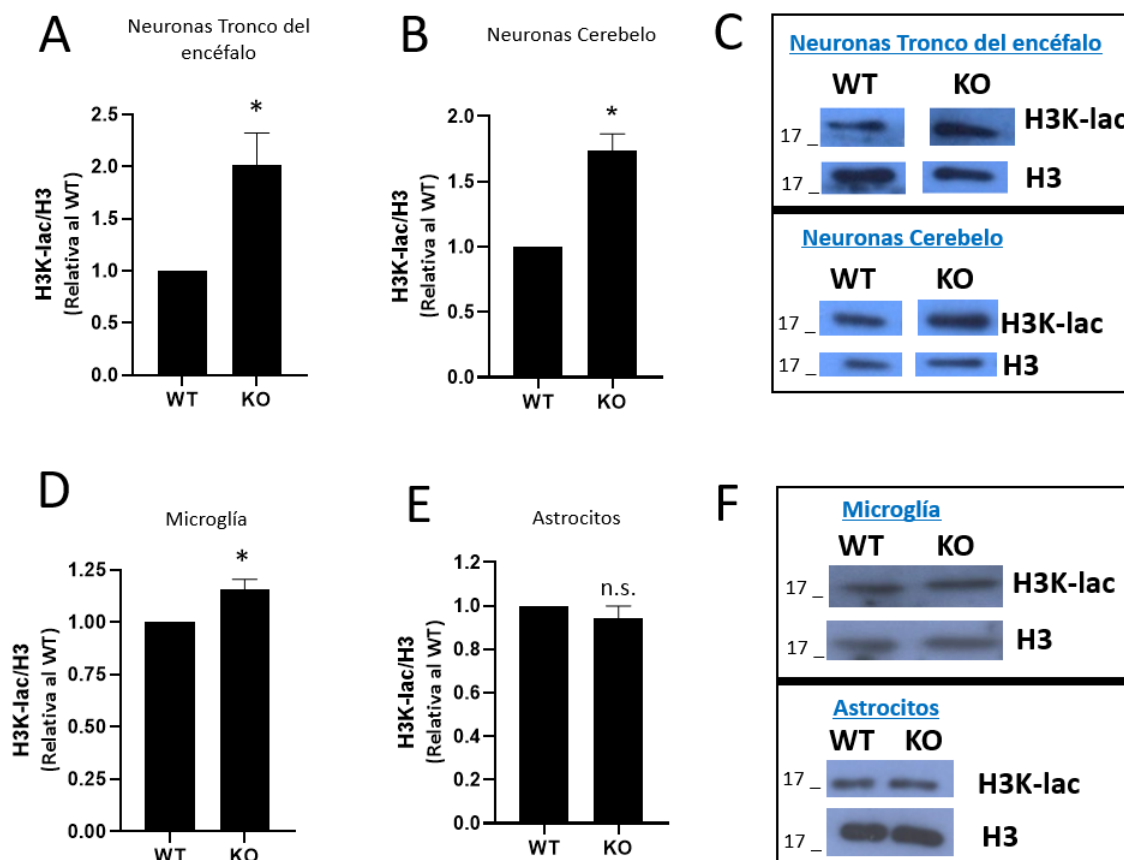


Figura 68: Neuronas NDUFS4-KO estimulan la lactilación derivada del aumento de la glucólisis. (A) Densitometría del Western blot de la lactilación de la H3 en neuronas WT y NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo (n = 4 experimentos independientes). (B) Densitometría del Western blot de la

lactilación de la H3 en neuronas WT y NDUFS4-KO cultivadas del cerebelo (n = 3 experimentos independientes). (C) Densitometría del Western blot de la lactilación de la H3 en microglía (n=3 experimentos independientes) y (D) astrocitos (n=3 experimentos independientes) WT y NDUFS4-KO cultivados del córtex cerebral. Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo. (E-H) Imágenes representativas del análisis por Western blot.

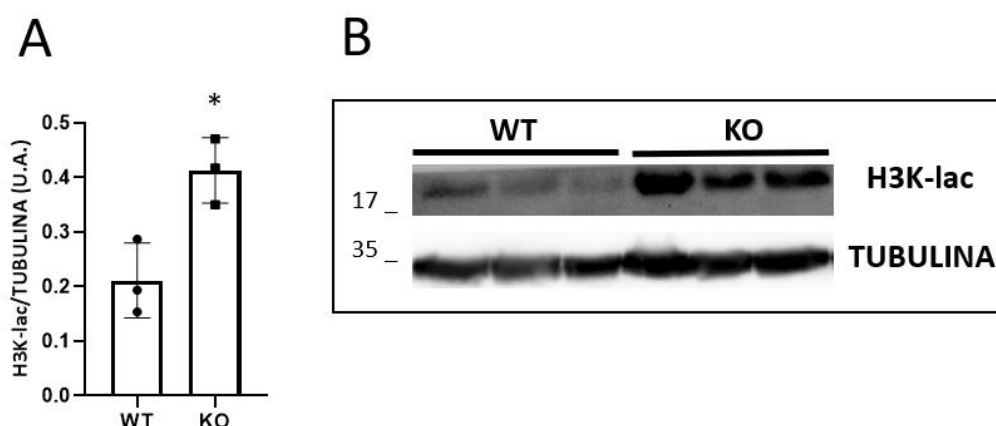


Figura 69: Ratones NDUFS4-KO estimulan la lactilación derivada del aumento de la glucólisis. (A) Densitometría del Western blot de la lactilación de la H3 en extractos de proteína de ratones WT y NDUFS4-KO del tronco del encéfalo de 48 días (n=3 ratones por condición WT y NDUFS4-KO). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo. (B) Imágenes representativas del análisis por Western blot anterior.

Durante la glucólisis también se forma inevitablemente el subproducto metilglioxal, el cual puede acumularse en la célula y reaccionar con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que puede afectar a la transcripción o al metabolismo celular. Estas reacciones son tóxicas para la célula y se ha visto que están relacionadas con algunas enfermedades neurodegenerativas [278]. No obstante, en situaciones normales las células están protegidas contra la toxicidad del metilglioxal [278]. Se midieron los niveles de metilglioxilización en extractos de proteína del tronco del encéfalo del modelo de ratón NDUFS4-KO en una fase sintomática del LS y se observó que había diferencias en las proteínas metilglioxiladas de ratones WT y NDUFS4-KO (Figura 70A y B). No obstante, se desconoce a qué proteínas corresponden las modificaciones de metilglioxato observadas.

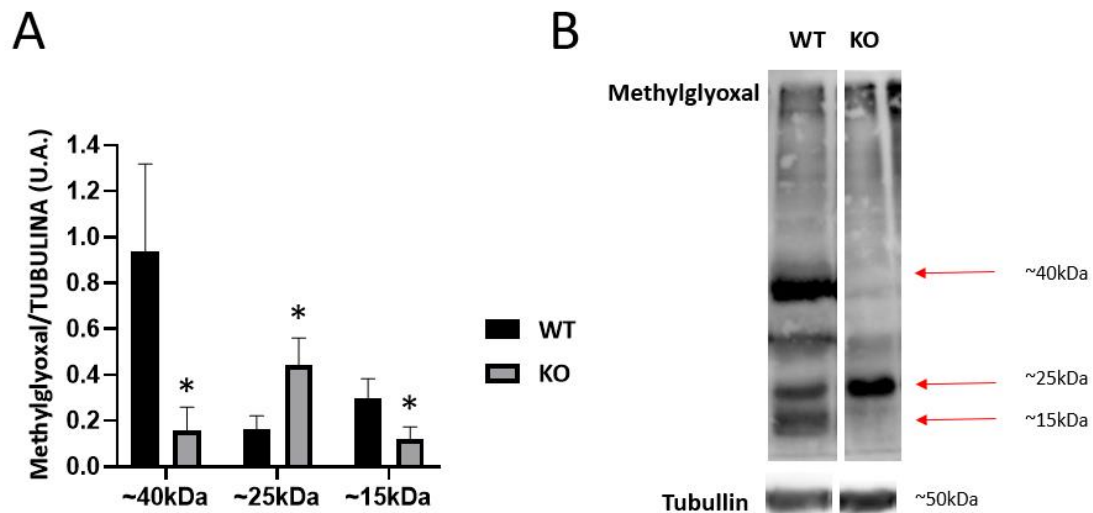


Figura 70: (A) Densitometría del Western blot de los extractos de proteína de neuronas WT y NDUFS4-KO del tronco del encéfalo de ratones de 48 días (n=3 ratones por condición WT y NDUFS4-KO). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo. (B) Imágenes representativas del análisis por Western blot anterior.

5. El CBD regula el metabolismo de la glucosa en las neuronas NDUFS4-KO.

5.1. El CBD regula la expresión de LDHA Y LDHB en neuronas NDUFS4-KO.

Una vez identificado LDH como una enzima desregulada en ratones NDUFS4-KO, estudiamos si el CBD podría normalizar los niveles de expresión de los genes LDHA y LDHB. Por lo tanto, se analizó la expresión de las enzimas LDHA y LDHB en neuronas NDUFS4-KO. Y, se observó que el CBD fue capaz de disminuir el ratio LDHA/LDHB, el cual estaba aumentado hacia la producción de lactato en cultivos NDUFS4-KO. Es decir, el CBD reguló a nivel transcripcional y postraduccionel el ratio de expresión de LDHA/LDHB favorable a la conversión de lactato en piruvato (Figura 71A y B).

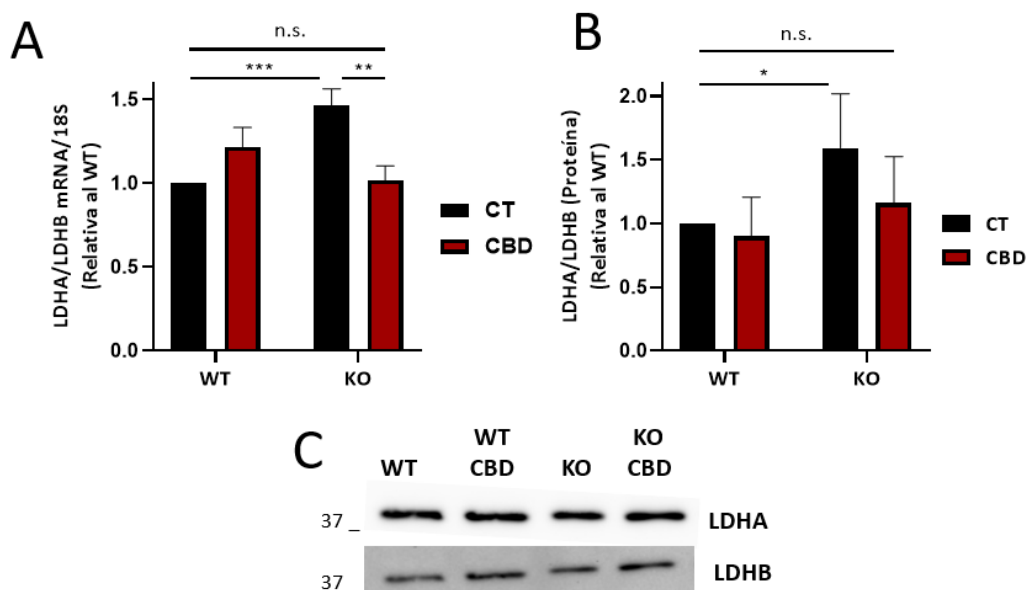


Figura 71: El CBD regula la expresión de LDHA Y LDHB en neuronas NDUF54-KO. (A) Análisis en la expresión del RNAm del ratio LDHA/LDHB mediante qPCR en neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con CBD (1 μ M) (n = 3 experimentos independientes). (B) Densitometría del Western blot del ratio LDHA/LDHB en neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con CBD (1 μ M) (n = 5 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo. (C) Imágenes representativas del análisis por Western blot anterior.

5.2. El CBD disminuye la captación de glucosa en neuronas NDUF54-KO.

En segundo lugar, se analizó si el CBD modificaba el transporte de glucosa alterada en neuronas cultivadas. Y, se observó que el CBD era capaz de reducir el transporte de glucosa aumentado en neuronas NDUF54-KO del tronco del encéfalo (Figura 72). Por lo que, el CBD es capaz de modificar el metabolismo de la glucosa reduciendo el transporte de glucosa y modulando las expresión transcripcional de la enzima LDH.

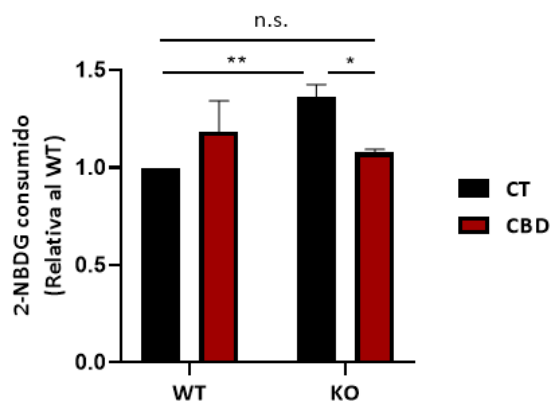


Figura 72: El CBD disminuye la captación de glucosa en neuronas NDUF54-KO. Captación de 2-NBDG en neuronas cultivadas WT y NDUF54-KO del tronco del encéfalo y tratadas o no con CBD (1 μ M) (n=3

experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

5.3. El CBD regula la vía AKT en neuronas NDUFS4-KO.

A continuación, intentamos averiguar el mecanismo por el cual el CBD puede modificar el metabolismo de la glucosa. La vía de señalización AKT es una vía de transducción de señales que promueve la supervivencia y el crecimiento celular. La proteína quinasa B o AKT es una proteína quinasa específica de serina/treonina que participa en la vía PI3K/AKT/mTOR y desempeña múltiples procesos celulares como el metabolismo de la glucosa, la apoptosis, la proliferación celular, la transcripción y la migración celular [414]. La señalización de Akt conduce a un mayor transporte de glucosa y estimula el metabolismo oxidativo regulando la glucólisis mediante la translocación de GLUT1 y GLUT3 a la superficie celular y mediante la activación de la fosfofructoquinasa (PFK) y la hexoquinasa (HK) [153, 415, 416] y, regulando positivamente el metabolismo de la glucosa al estimular la señalización de mTOR [417, 418]. Se ha visto que el CBD es capaz de inactivar la vía AKT [419, 420]. Y, se ha relacionado la inactivación de AKT con los efectos antiinflamatorios mediados por el CBD [350].

Por lo tanto, se estudió el efecto del CBD en la señalización de AKT. Primero investigamos la actividad de AKT en neuronas NDUFS4-KO. Se determinó su actividad mediante Western blot, midiendo los niveles de AKT fosforilada en el residuo S473. Y, se observó que en cultivos neuronales NDUFS4-KO tanto del tronco del encéfalo como del cerebelo los niveles de AKT fosforilada estaban aumentados (Figura 73A y B). Además, se estudiaron sus niveles de fosforilación in vivo también y se observó un aumento en el modelo de ratón NDUFS4-KO en una fase asintomática del LS (Figura 73C). No obstante, en ratones NDUFS4-KO con un estado patológico avanzado se observa una disminución en su activación (Figura 73D). Estos resultados indican que la señalización de AKT esta hiperactivada en neuronas NDUFS4-KO, correlacionado con el aumento en el metabolismo glucolítico observado.

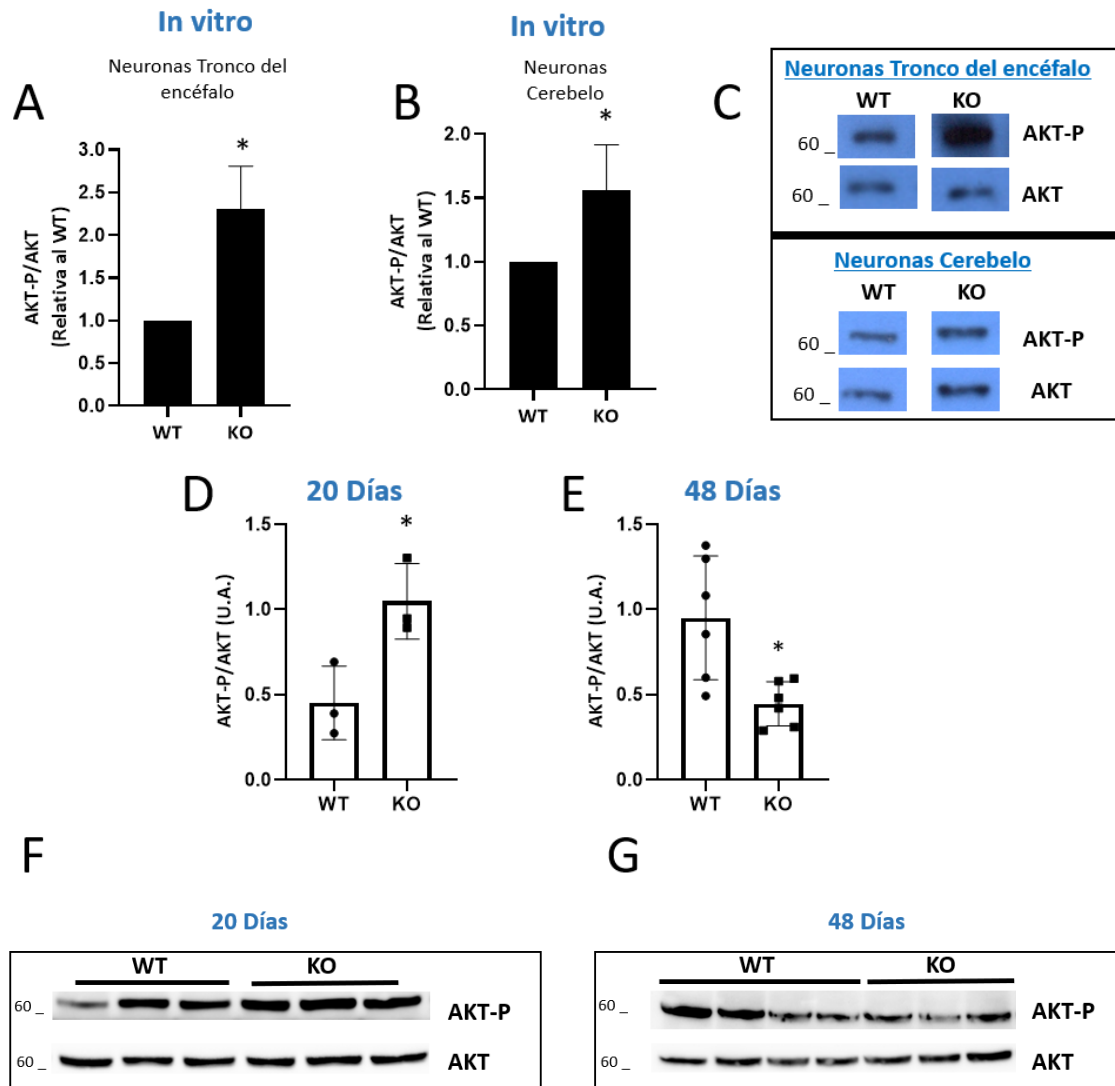


Figura 73: Las falta de de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial activa la vía AKT. (A) Se analizaron los niveles de AKT fosforilada (AKT-P) por densitometría de las bandas del Western blot de neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo (n = 5 experimentos independientes) y (B) del cerebelo (n = 4 experimentos independientes). (C) Imágenes representativas del análisis por Western blot. (D) Niveles de AKT fosforilada (AKT-P) por densitometría de las bandas del Western blot de extractos de proteína del tronco del encéfalo de ratones de 20 días (n=3 ratones por condición WT y NDUF54-KO) y (D) 48 días (n=6 ratones por condición WT y NDUF54-KO). (E) Imágenes representativas de western blot de ratones de 20 días y (F) 48 días. Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo.

Así pues, nos preguntamos si el CBD era capaz de recuperar la AKT hiperactivada en cultivos NDUF54-KO. El CBD redujo considerablemente la activación de AKT en neuronas NDUF54-KO del tronco del encéfalo (Figura 74A). No obstante, en neuronas del cerebelo el CBD no redujo significativamente la activación de AKT, aunque los resultados indican que parece que hay una tendencia a disminuir (Figura 74B).

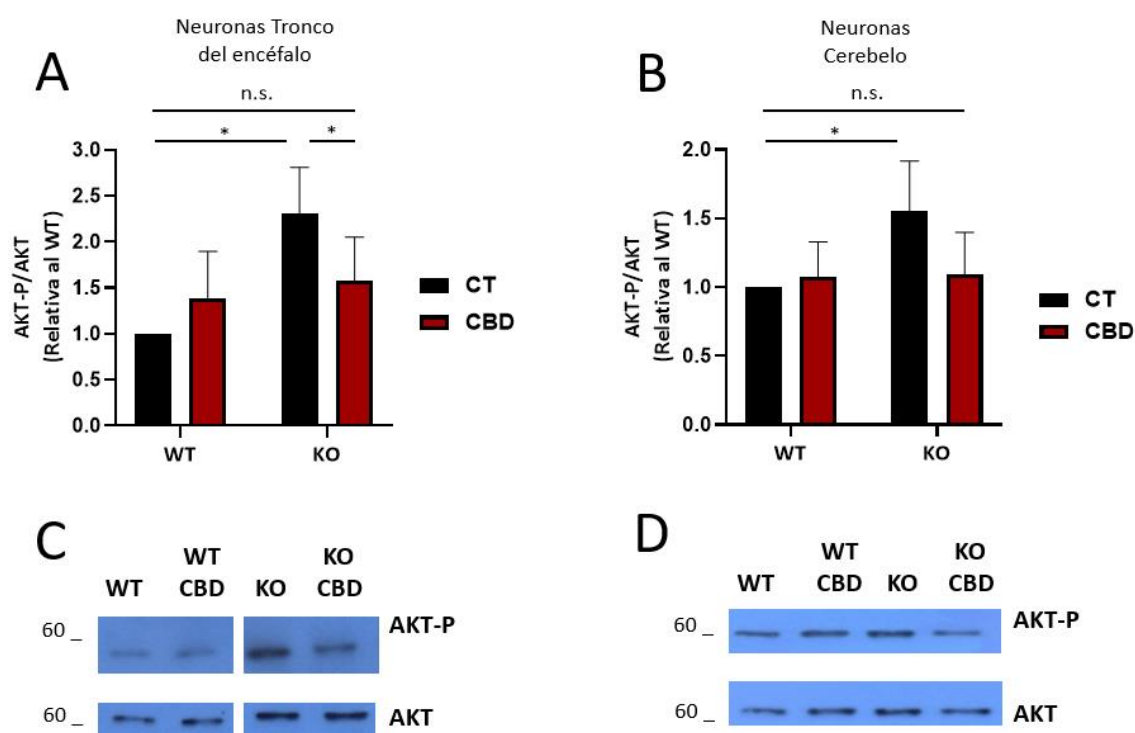


Figura 74: El CBD regula la vía AKT en neuronas NDUF54-KO. (A) Se analizaron los niveles de AKT fosforilada (AKT-P) por densitometría de las bandas del Western blot de neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con CBD (1 μ M) (n = 4 experimentos independientes) y (B) del cerebelo (n = 5 experimentos independientes). (C) Imágenes representativas del western blot de tronco del encéfalo y (D) cerebelo. Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * p < 0,05, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

5.4. La inhibición de la vía AKT disminuye la liberación de lactato en neuronas NDUF54-KO.

Se estudió la liberación de lactato en neuronas NDUF54-KO *in vitro* con la vía AKT inhibida, con el fin de determinar si la disminución en la liberación de lactato observada en neuronas NDUF54-KO tratadas con CBD era mediante la reducción de la vía de AKT. Se usaron dos inhibidores distintos de AKT para descartar que los resultados se debiesen a efectos inespecíficos de los inhibidores. El inhibidor de AKT, API-2, bloquea el exceso de lactato en neuronas NDUF54-KO, como se observa en la (Figura 75B). Lo que indica que el CBD podría estar reduciendo la liberación de lactato mediante la reducción de la actividad de AKT.

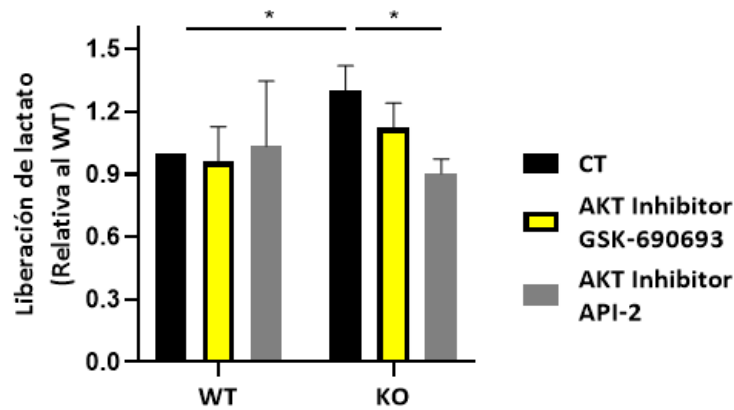


Figura 75: La inhibición de AKT disminuye la liberación de lactato en neuronas NDUFS4-KO. Lactato liberado al medio de neuronas WT y NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con GSK-690693 (2 μ M) o con API-2 (20 μ M) (n=5 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

5.5. El CBD disminuye la lactilación en neuronas NDUFS4-KO.

La lactilación de histonas en los promotores de los genes glucolíticos HIF-1 α , PKM y LDHA promueve y activa su transcripción, aumentando así la actividad glucolítica [421]. Esto está acorde con los resultados anteriores, en los que se observa un aumento en la lactilación de la H3 junto con un aumento en la expresión de genes glucolíticos en neuronas del tronco del encéfalo de ratones NDUFS4-KO. La lactilación es dependiente de LDHA [310], por lo tanto, puesto que el CBD reduce la expresión y actividad de LDHA in vitro, nos preguntamos si también es capaz de reducir la lactilación de la H3 en cultivos NDUFS4-KO. Se observó que el CBD disminuyó la lactilación de la H3 en neuronas NDUFS4-KO del tronco del encéfalo (Figura 76A y B). Por tanto, el aumento de lactato de neuronas NDUFS4-KO es responsable de la lactilación de histonas, y la reducción del lactato con el CBD es suficiente para disminuir la lactilación.

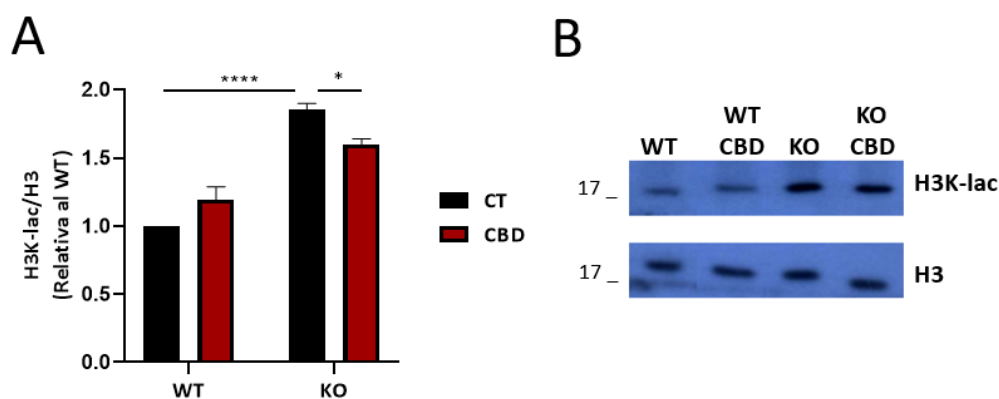


Figura 76: El CBD disminuye la lactilación en neuronas NDUF54-KO. (A) Densitometría del Western blot de la lactilación de la H3 en neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con CBD (1 μ M) (n = 4 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * p < 0,05, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo. (B) Imágenes representativas del análisis por Western blot de neuronas del tronco del encéfalo.

6. El agonista de PPAR γ regula el metabolismo del lactato en neuronas NDUF54-KO.

6.1. La actividad de PPAR γ se ve reducida en neuronas NDUF54-KO.

La mejora en la sintomatología observada en ratones con síndrome de Leigh tratados con CBD por nuestros colaboradores de la UAB era dependiente de PPAR γ . El CBD, además de actuar en los receptores cannabinoides, también puede activar PPAR γ [340, 422]. Los PPAR son receptores nucleares dependientes de ligando que pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción de receptores de hormonas nucleares [154]. En concreto, PPAR γ es un factor clave en la función mitocondrial y las enfermedades neurológicas que, regula la expresión de genes implicados en el equilibrio redox, respuestas inmunológicas y, el metabolismo y la función mitocondrial [158].

Todos estos procesos están altamente comprometidos en el Síndrome de Leigh, por lo que resulta interesante estudiar la función de PPAR γ en células con la función mitocondrial alterada, NDUF54-KO. Primero, se determinó la expresión transcripcional de PPAR γ en tejido del tronco del encéfalo y del cerebelo en el modelo de ratón NDUF54-KO en una fase sintomática del LS. Se observó la expresión de PPAR γ solo estaba disminuida en el tejido del tronco del encéfalo (Figura 77).

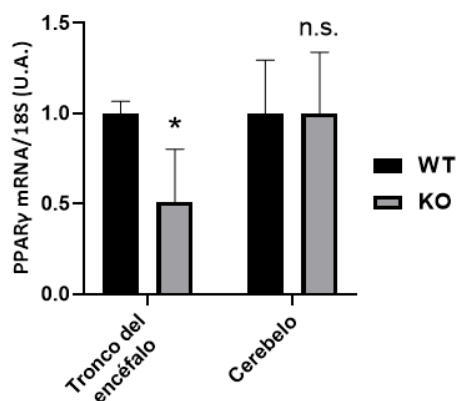


Figura 77: Se determinó la expresión del RNAm de PPAR γ mediante qPCR de RNA extraído de tejido del tronco del encéfalo y cerebelo de ratones de 48 días (n=3-5 ratones por condición WT y NDUFS4-KO). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo.

A continuación, se analizó la actividad de PPAR γ transfectando neuronas cultivadas del tronco del encéfalo con un plásmido que expresa luciferasa regulada por el elemento de respuesta a PPAR, PPRE, y se observó una disminución del 55% en la actividad de PPAR γ en neuronas NDUFS4-KO (Figura 78A). No obstante, en cultivos primarios de astrocitos NDUFS4-KO no se observaron diferencias significativas (Figura 78B).

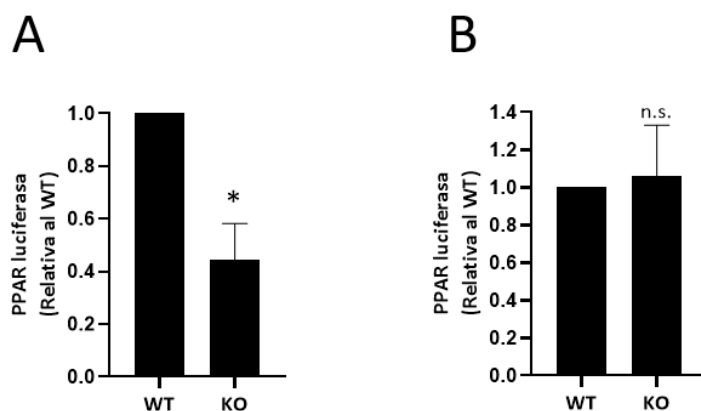


Figura 78: La actividad de PPAR γ se ve reducida en neuronas NDUFS4-KO. (A) Análisis mediante el gen reportero de luciferasa de la actividad transcripcional de PPAR γ en neuronas WT y NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo (n = 4 experimentos independientes) y (B) astrocitos WT y NDUFS4-KO cultivados del córtex cerebral (n = 5 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. n.s. = no significativo.

6.2. La rosiglitazona recupera la actividad de PPAR γ reducida en neuronas NDUFS4-KO.

Para estudiar si la actividad de PPAR γ provoca los mismos efectos que el CBD sobre las neuronas NDUFS4-KO, tratamos los cultivos neuronales primarios con la RSG, el agonista

de PPAR γ , con el fin de restaurar la actividad de PPAR γ a los niveles del WT. Se observó que en cultivos del tronco del encéfalo la RSG era capaz de recuperar la actividad de PPAR γ alterada en las neuronas NDUFS4-KO (Figura 79A). No obstante, la RSG no incrementó la actividad de PPAR γ en neuronas WT (Figura 79A). Esto podría deberse a que en neuronas WT el PPAR γ está plenamente activo. Para verificar esto se sobreexpresó PPAR γ exógenamente en neuronas WT y en neuronas NDUFS4-KO. En estas condiciones se observó que la RSG cuatuplicó la actividad de PPAR γ tanto en neuronas WT como en neuronas KO para la subunidad NDUFS4 (Figura 79B). Lo que parece indicar que en los cultivos neuronales de neuronas WT la RSG no incrementa la actividad de PPAR γ debido a que todo el PPAR γ que hay está activo.

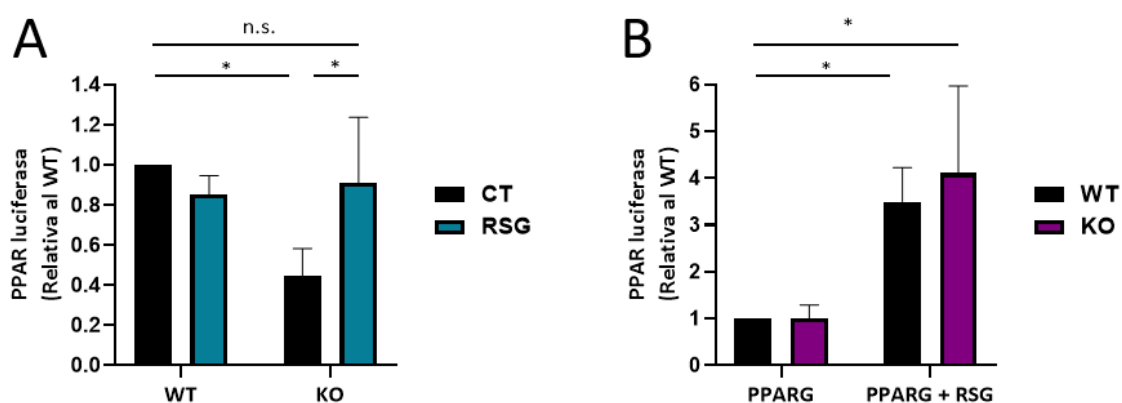


Figura 79: La RSG recupera la actividad de PPAR γ reducida en neuronas NDUFS4-KO. (A) Análisis mediante el gen reportero de luciferasa de la actividad transcripcional de PPAR γ en neuronas WT y NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con RSG (1 μ M) (n = 4 experimentos independientes). (B) Análisis mediante el gen reportero de luciferasa de la actividad transcripcional de PPAR γ en neuronas WT y NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo transfectadas con el plásmido PPAR γ y tratadas o no con RSG (1 μ M) (n = 4 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * p < 0,05, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

6.3. La RSG disminuye el flujo glucolítico en neuronas NDUFS4-KO.

Por lo tanto, visto que el CBD es capaz de modificar el metabolismo del lactato en neuronas NDUFS4-KO, nos preguntamos si la RSG también. Para ello, se estudió la acción de la RSG en el metabolismo de la glucosa en neuronas cultivadas del tronco del encéfalo de ratones WT y NDUFS4-KO. Primero, se analizaron los niveles de lactato en el medio de cultivos celulares tratados con RSG y, se observó que la RSG únicamente normalizó los niveles de lactato alterados en neuronas NDUFS4-KO del tronco del encéfalo (Figura

80A) y en microglía NDUF54-KO cultivada (Figura 80B). Sin embargo, no fue capaz de normalizar el incremento producido en neuronas NDUF54-KO cultivadas de cerebelo (Figura 80C).

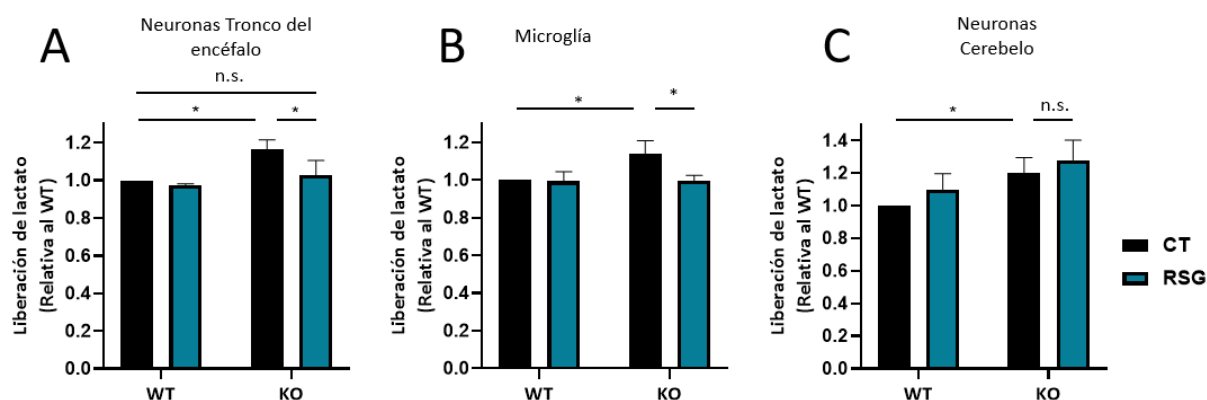


Figura 80: La RSG disminuye el flujo glucolítico en neuronas NDUF54-KO. (A) Lactato liberado al medio de neuronas WT y NDUF54-KO tratadas o no con RSG (1 μ M) 24h cultivadas del tronco del encéfalo (n=3 experimentos independientes), (B) de microglía WT y NDUF54-KO tratada o no con RSG (1 μ M) 24h cultivada del córtex cerebral (n=3 experimentos independientes) y (C) de neuronas WT y NDUF54-KO de cerebelo (n=5 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * p < 0,05, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

Seguidamente, analizamos la captación de glucosa en neuronas del tronco del encéfalo, no obstante, en nuestros resultados observamos que la RSG no solo no modificó el mayor transporte de glucosa que se observa en neuronas NDUF54-KO, sino que aumentó la captación de glucosa de neuronas cultivadas WT (Figura 81). Por lo tanto, la RSG es capaz de normalizar el flujo glucolítico sin afectar la captación de glucosa en neuronas NDUF54-KO del tronco del encéfalo.

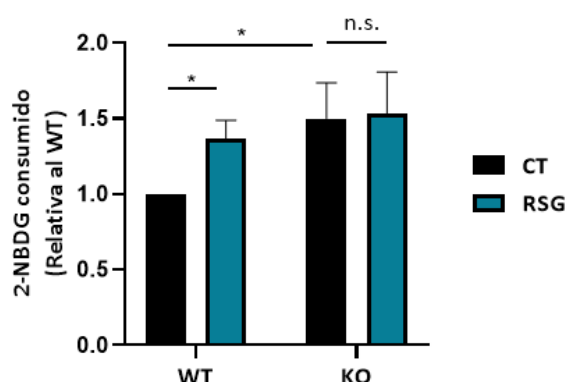


Figura 81: La RSG no disminuye la captación de glucosa en neuronas con NDUF54-KO. Captación de 2-NBDG en neuronas cultivadas WT y NDUF54-KO del tronco del encéfalo y tratadas o no con RSG (1 μ M) 24h (n=3 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * p < 0,05, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

Finalmente, con el objetivo de determinar el mecanismo mediante el cual la RSG disminuye la liberación de lactato en neuronas NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo, se analizó la expresión de las enzimas LDHA y LDHB. No obstante, la RSG no fue capaz de regular la expresión transcripcional del ratio LDHA/LDHB que se encuentra alterado en neuronas NDUFS4-KO (Figura 82A). A continuación, analizamos la expresión de MCT2, el transportador con mayor expresión en neuronas, y observamos que la RSG indujo un aumento en la expresión a nivel transcripcional (Figura 82B). Por lo que parece que el mecanismo mediante el cual la RSG podría regular el flujo glucolítico en neuronas NDUFS4-KO es distinto al del CBD.

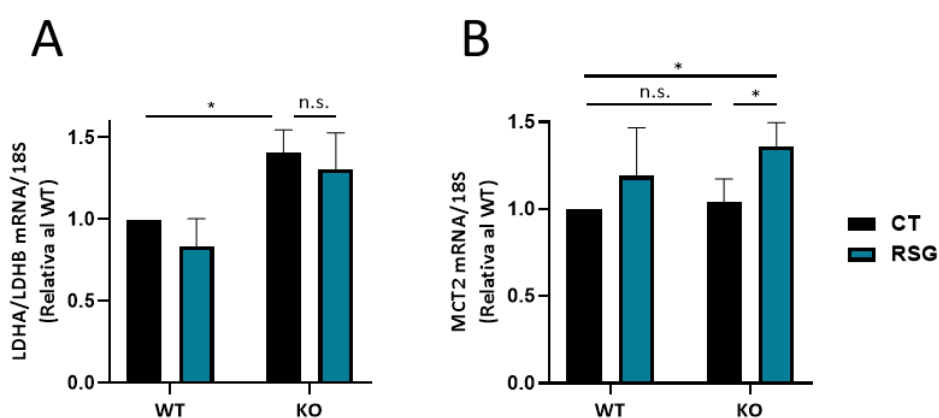


Figura 82: La RSG no regula la expresión de LDHA Y LDHB en neuronas NDUFS4-KO. (A) Análisis en la expresión del RNAm del ratio LDHA/LDHB mediante qPCR en neuronas WT y NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con RSG (1 μ M) 24h (n = 4 experimentos independientes). (B) Análisis en la expresión del RNAm de MCT2 mediante qPCR en neuronas WT y NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con RSG (1 μ M) 24h (n = 5 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * p < 0,05, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

6.4. La RSG disminuye la lactilación en neuronas NDUFS4-KO.

Como se ha comentado con anterioridad la lactilación es una modificación postraducciona que juega un papel clave en la remodelación de histonas y la transcripción génica [310]. Por lo que, dado que la RSG es capaz de reducir la liberación de lactato en neuronas NDUFS4-KO del tronco del encéfalo (Figura 80A), estudiamos el efecto de la RSG en la lactilación de la H3. Y, el estudio reveló que, al igual que el CBD, la RSG redujo la lactilación dependiente de lactato en cultivos NDUFS4-KO del tronco del encéfalo (Figura 83A y B).

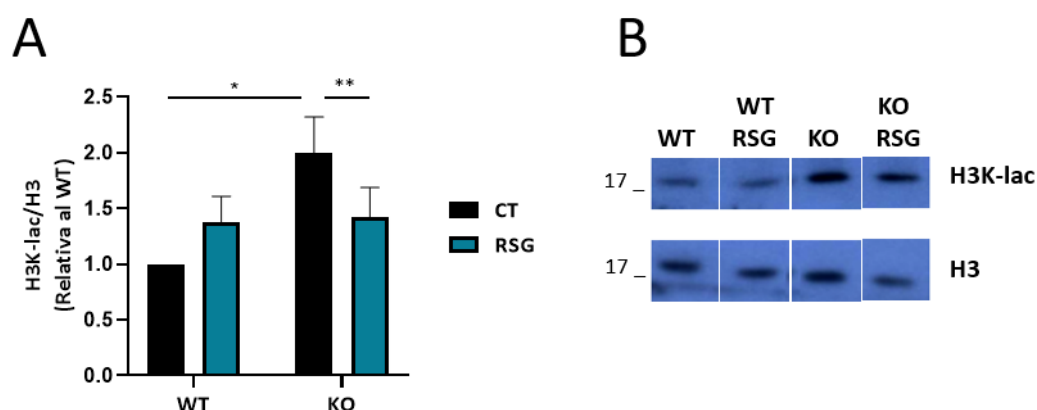


Figura 83: La RSG disminuye la lactilación en neuronas NDUF54-KO. (A) Densitometría del Western blot de la lactilación de la H3 en neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con RSG (1 μ M) 24h (n = 3 experimentos independientes). (B) Imágenes representativas del análisis por Western blot de neuronas del tronco del encéfalo. Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * p <0,05, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

6.5. La rosiglitazona normaliza el MMP reducido en neuronas NDUF54-KO.

Se ha descrito ampliamente que PPAR γ es un actor clave en la función mitocondrial [158]. La RSG es capaz de recuperar la actividad de PPAR γ disminuida en neuronas NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo y, esta recuperación es suficiente para disminuir su flujo glucolítico. Así pues, se estudió el efecto del activador de PPAR γ en la bioenergética mitocondrial de neuronas NDUF54-KO. Y, se observó que la RSG era capaz de recuperar el potencial de membrana mitocondrial en neuronas con disfunción mitocondrial NDUF54-KO (Figura 84). Lo que podría indicar que al mejorar la función mitocondrial una mayor proporción de la glucosa consumida sería metabolizada en las mitocondrias en lugar de producir lactato.

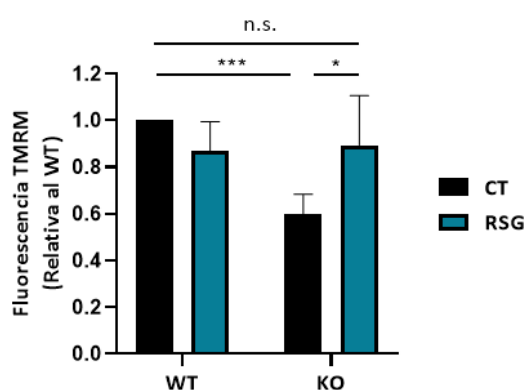


Figura 84: El potencial de membrana mitocondrial de neuronas NDUF54-KO se recuperó estimulando la actividad de PPAR γ . (A) MMP determinado mediante la fluorescencia de TMRM (6nM) en neuronas WT y

NDUFS4-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con RSG durante 24 h (1 μ M) (n = 5 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * p <0,05, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

6.6. El redireccionamiento de sustratos a las mitocondrias recupera el potencial de membrana mitocondrial en neuronas NDUFS4-KO.

Para investigar el papel del redireccionamiento de los sustratos sobre el MMP se utilizaron dos fármacos; el Oxamate, que inhibe la LDH, y el Honokiol, un activador de Sirt3. La mayor parte del ATP generado en la neurona se produce en las mitocondrias, donde el piruvato es oxidado a partir de la OXPHOS para generar ATP [65]. Por lo que, un incremento en la producción de lactato puede generar menos entrada de piruvato a las mitocondrias y, por tanto, disminuir la producción de energía. Dado que el lactato se encuentra aumentado en los cultivos NDUFS4-KO y, con el fin de dirigir más piruvato a las mitocondrias y así ser metabolizado por OXPHOS, se inhibió la actividad de la lactato deshidrogenasa mediante tratamientos con Oxamate. Se observó que tratamientos con Oxamate recuperaron el potencial de membrana mitocondrial en neuronas NDUFS4-KO del tronco del encéfalo (Figura 85A).

La PDH participa en la transformación del piruvato en acetil-CoA que, posteriormente se utiliza tanto en el ciclo de Krebs como en la fosforilación oxidativa para generar ATP [423]. La deficiencia de la subunidad mitocondrial NDUFS4 se ha visto que provoca un aumento en la hiperacetilación de la PDH, volviéndola más inactiva [424]. Por lo tanto, nos preguntamos si estimulando la actividad de Sirt3, una deacetilasa que regula diferentes enzimas del metabolismo mitocondrial [425], desacetilaría PDH y permitiría la entrada de más sustrato al ciclo de Krebs. Aquí mostramos que el tratamiento con Honokiol recuperó el potencial de membrana mitocondrial en neuronas NDUFS4-KO del tronco del encéfalo (Figura 85A y B). Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que, estimular el metabolismo mitocondrial puede ser una buena estrategia terapéutica para hacer frente al exceso de lactato observado en neuronas del tronco del encéfalo NDUFS4-KO.

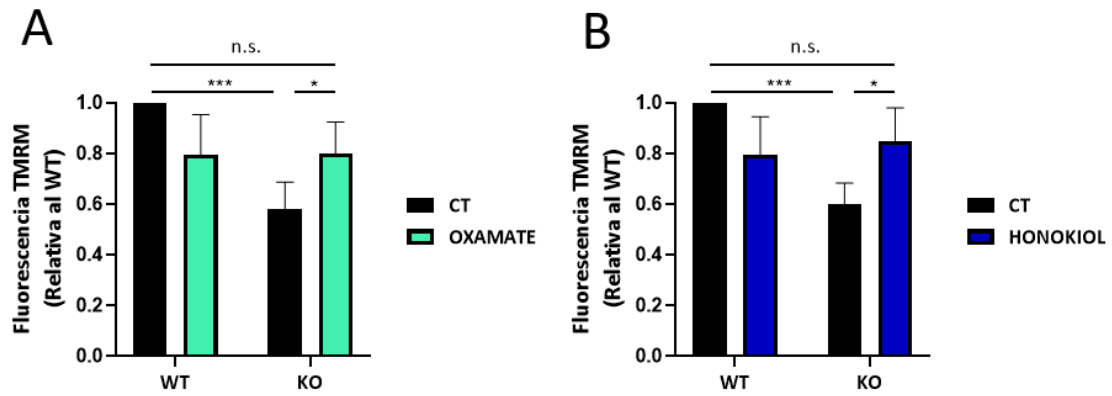


Figura 85: El potencial de membrana mitocondrial de neuronas NDUF54-KO se recuperó estimulando el metabolismo mitocondrial. (A) MMP determinado mediante la fluorescencia de TMRM (6nM) en neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con Oxamate durante 2 h (40 mM) (n = 7 experimentos independientes). (B) MMP determinado mediante la fluorescencia de TMRM (6nM) en neuronas WT y NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo y tratadas o no con Honokiol durante 24 h (40 mM) (n = 5 experimentos independientes). Los valores representan la media $\pm$ e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. n.s. = no significativo.

DISCUSIÓN

1. La actividad sináptica regula el metabolismo del hierro mitocondrial para mejorar la bioenergética neuronal.

El desarrollo del cerebro y la función cognitiva requieren una gran cantidad de energía, consumiendo hasta un 20% de la cantidad total de glucosa utilizada por el cuerpo [257, 258, 274]. En el cerebro la glucosa es principalmente consumida por las neuronas y oxidada por la OXPHOS con el objetivo de generar grandes cantidades de ATP necesarias para mantener los gradientes iónicos y los diferentes procesos relacionados con la regulación de transmisión sináptica [65]. Siendo alrededor del 75% del gasto energético del cerebro utilizado en procesos relacionados con la transmisión sináptica, como el restablecimiento del equilibrio iónico o el reciclaje de neurotransmisores [65].

Como consecuencia de la actividad sináptica existen adaptaciones estructurales y funcionales en las que las sinapsis se potencian dando como resultado un aumento en la fuerza de estas sinapsis, una forma de plasticidad sináptica que está involucrada en el aprendizaje y la memoria [426]. Por lo tanto, las neuronas que han experimentado actividad sináptica deben experimentar una remodelación bioenergética duradera para soportar una mayor demanda energética relacionada con la actividad [366, 367]. Ya que, como consecuencia de la plasticidad sináptica se produce un aumento en el gasto de energía y, por lo tanto, se requiere un mayor suministro de ATP [65]. Se han estudiado los cambios metabólicos que se producen durante la actividad sináptica. Pero, los efectos duraderos de la actividad sináptica sobre el metabolismo neuronal han sido poco estudiados. En nuestros resultados mostramos que las mitocondrias de las neuronas que han experimentado un periodo de actividad sináptica muestran una mejora en su bioenergética que dura más allá del periodo de actividad. Y para esta mejora en la bioenergética se requiere una mayor captación de hierro mitocondrial, el cual es esencial en los complejos del sistema OXPHOS [373, 374]. En el interior de la célula el hierro se utiliza principalmente para la síntesis de grupos ISC y hemo, componentes esenciales de los complejos de la cadena de transporte de electrones y de algunas enzimas del ciclo de Krebs [373, 374].

La actividad sináptica, al activar diferentes factores de transcripción, es uno de los inductores más potentes de la expresión génica [375]. Aquí hemos visto que CREB es el

factor de transcripción responsable de la inducción de la expresión de MFRN1, el transportador de hierro mitocondrial [19] y, que esta inducción es necesaria para la mejora en la bioenergética mitocondrial (Figura 86). CREB se ha relacionado con procesos que requieren demandas energéticas crecientes como la plasticidad neuronal, la supervivencia celular y el crecimiento de neuritas [79, 375-377]. De acuerdo con nuestros resultados, sugerimos que CREB regula de manera coordinada la expresión de genes importantes para la función neuronal y la expresión de genes bioenergéticos necesarios para satisfacer los altos requerimientos energéticos de estos procesos neuronales, preparando a las neuronas para lidiar con el estrés energético asociado con la actividad sináptica. Por lo tanto, el mecanismo dependiente de hierro por el cual la actividad sináptica mejora la bioenergética mitocondrial más allá del periodo de actividad, es relevante para hacer frente a la creciente demanda energética asociada con la actividad sináptica.

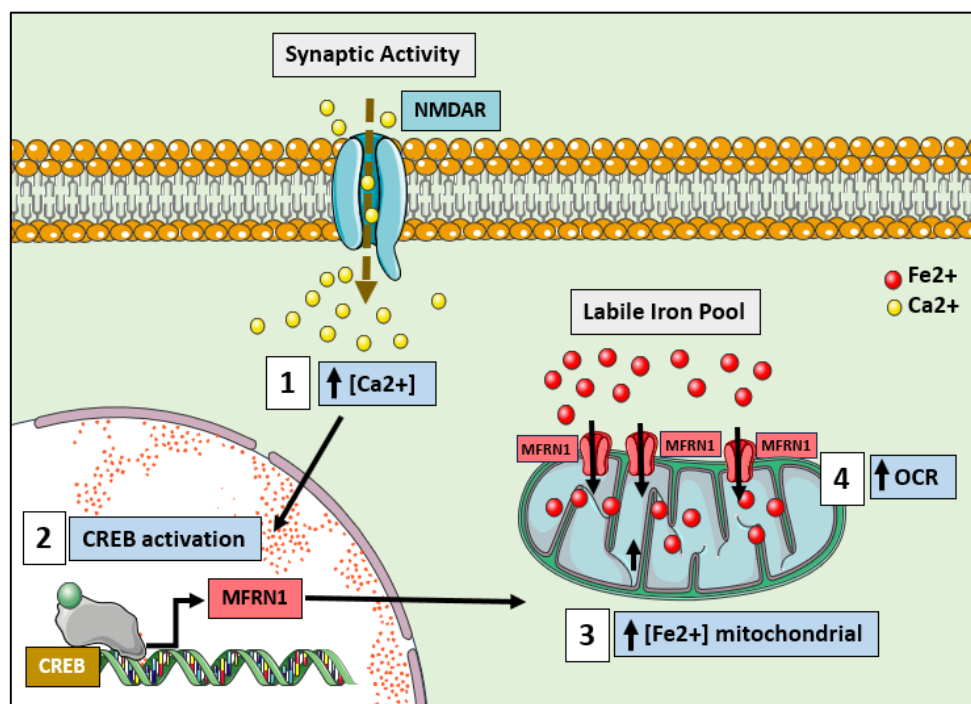


Figura 86: Modelo del mecanismo por el cual la actividad sináptica mejora bioenergética mitocondrial al inducir la expresión de MFRN1. (1) La actividad sináptica estimula la entrada de Ca²⁺ al citoplasma que activa el factor de transcripción CREB. (2) CREB induce la transcripción del transportador de hierro mitocondrial MFRN1. (3) Como consecuencia, se incrementa el hierro mitocondrial (4) dando como resultado una mejora en la OCR. Algunas de las figuras utilizadas en este esquema se han obtenido y modificado a partir de Smart Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

El hierro es un metal esencial que funciona como cofactor de diferentes enzimas implicadas en la síntesis de neurotransmisores y, en los oligodendrocitos, es necesario para la mielinización [222]. Por tanto, el hierro es necesario para el correcto funcionamiento del cerebro [222]. En consecuencia, la deficiencia de hierro durante la vida fetal tardía y posnatal temprana provoca alteraciones del aprendizaje y la memoria [225]. Sin embargo, el exceso de hierro se asocia con el envejecimiento y los trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, entre otras [226, 248-252]. El hierro en exceso puede participar en la producción de ROS y en la peroxidación lipídica dependiente de hierro a través de la reacción de Fenton, provocando un tipo de muerte celular regulada conocida como ferroptosis [240].

En nuestros resultados hemos observado que en cultivos corticales de rata la actividad sináptica induce a nivel transcripcional la expresión de genes implicados en el transporte de hierro celular MFRN1, TRFC1, DMT1 y Fpn. MFRN1 se encuentra en las mitocondrias y se encarga de la captación de hierro mitocondrial [19]. Y, en la membrana celular TRFC1 y DMT1 median el transporte de hierro intracelular, siendo DMT1 el transportador que libera el hierro del endosoma al citosol, mientras que Fpn media la salida de hierro celular [18]. De acuerdo con esto, las neuronas activas experimentan un aumento en los niveles de hierro mitocondrial y citoplasmático. Por lo tanto, los cambios transcripcionales inducidos por la actividad sináptica responden de manera adaptativa a los requisitos bioenergéticos asociados con la actividad neuronal. Pero como se ha mencionado, el exceso de hierro es tóxico [240]. Sin embargo, mostramos que las neuronas activas son resistentes a la toxicidad mediada por Fe^{2+} . Una posible explicación a esta resistencia es la inducción a nivel transcripcional de la expresión del sistema xc-antiportador de cisteína-glutamato y la síntesis de glutatión, que es la principal vía de control de la ferroptosis [241, 246]. Esto, junto con la inducción simultánea de genes de captación y eflujo de hierro, puede representar un mecanismo de defensa contra la ferroptosis al lograr niveles equilibrados de hierro intracelular. De hecho, la mejora en la exportación celular de hierro hace que las células sean más resistentes a la ferroptosis [383, 384]. Todo esto sugiere que la actividad sináptica, al tiempo que aumenta los niveles de hierro intracelular, regula coordinadamente un programa transcripcional para proteger contra la ferroptosis.

2. La deficiencia de NDUF54 altera el metabolismo del hierro celular contribuyendo a la peroxidación lipídica.

La mitocondria juega un papel esencial en la fisiología neuronal. Cuando las mitocondrias no funcionan correctamente, se observan alteraciones en la eficiencia de diferenciación neuronal durante la neurogénesis, así como en el crecimiento neurítico, afectando el estado fisiológico y funcional de estas durante el desarrollo y después del mismo [70-73]. Mutaciones que limitan la capacidad mitocondrial para generar energía conducen a un grupo de enfermedades graves conocidas como enfermedades mitocondriales [8]. En la patología de estas enfermedades, el cerebro no cumple con la demanda energética necesaria y se manifiestan una amplia gama de síntomas clínicos [8]. Entre ellas, el Síndrome de Leigh es la patología mitocondrial pediátrica más común y de la cual no existen tratamientos efectivos disponibles [191]. Esta enfermedad mitocondrial es causada por mutaciones en más de 75 genes nucleares o mitocondriales, como en subunidades del complejo I (NDUF54), del complejo IV (COX10), de factores de ensamblaje (SURF1), enzimas metabólicas (PDHA1) y proteínas de transporte (SLC19A3) [427]. Aunque, casi el 35% de los casos de síndrome de Leigh son causados mutaciones que afectan al Complejo I [427, 428]. La patología del síndrome de Leigh se caracteriza por lesiones simétricas en el sistema nervioso central, predominantemente de ganglios basales, el cerebelo, el tronco encefálico y el bulbo olfatorio [197].

La línea de ratón NDUF54-KO tienen una expresión disminuida de casi todas las subunidades del Complejo I y muestra fenotipos similares a los de los pacientes con Síndrome de Leigh, con una patología similar, mostrando estrés oxidativo, neuroinflamación y lesiones cerebrales [215-217]. Se ha visto que los ratones NDUF54-KO presentan acumulación de hierro en varios tejidos, y un aumento de los niveles del subproducto de peroxidación lipídica MDA y cambios en las proteínas TFR1 y las subunidades de ferritina en el hígado [386]. Por lo tanto, el exceso de hierro observado en ratones NDUF54-KO sugiere que hay un exceso de hierro corporal en el contexto de esta deficiencia del Complejo I. Se ha visto que la inhibición del Complejo I mitocondrial *in vitro* aumenta los niveles de hierro lábil tanto citosólico como mitocondrial [429].

En nuestros resultados hemos observado que la falta de la subunidad mitocondrial NDUFS4 en el tronco encefálico del modelo de ratón NDUFS4-KO en una fase asintomática y sintomática del LS estimula la expresión transcripcional del gen TFRC1, encargado de transportar el hierro al interior de la célula. La sobreexpresión del transportador de ferritina TFRC1 se ha relacionado con la acumulación de hierro intracelular y la muerte por ferroptosis [430]. El cerebro es un órgano sensible al hierro, por lo que alteraciones en la homeostasis del hierro a nivel cerebral pueden provocar cambios patológicos graves en el SNC [225, 226]. El hierro es ampliamente reconocido como un mediador crítico en la progresión de muchas enfermedades neurodegenerativas genéticas y relacionadas con la edad [226, 248-252]. La ferroptosis y la acumulación de hierro se relacionan con trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson [248-252]. Por ejemplo, la deposición de hierro en los ganglios basales de pacientes con enfermedad de Parkinson y modelos de ratón, acelera la agregación de alfa-sinucleína, promueve la acumulación de radicales libres, aumenta la peroxidación lipídica y está implicada en la demencia y el deterioro motor [226].

Por lo tanto, para mantener la homeostasis celular el metabolismo del hierro está estrictamente regulado mediante moléculas reguladoras clave. ACO1 y IRP2 son proteínas capaces de inhibir la traducción del RNAm de proteínas involucradas en el metabolismo del hierro o proteger el RNAm de contra la degradación mediada por nucleasas [236]. Las proteínas IRP2 y ACO1, también conocida como IRP1, son capaces de inhibir la traducción del RNAm de Fpn y ferritina al unirse a los IRE en las regiones UTR 5' del RNAm y, inhiben la degradación del RNAm del receptor de transferrina al unirse a los IRE en la región UTR 3' del RNAm del receptor de transferrina, que de otro modo se degrada rápidamente [236]. Se ha observado que la falta de la subunidad NDUFS4 en la fase asintomática del LS provoca una reducción en la expresión de las proteínas ACO1 y IRP2. Los IRP son los principales reguladores de la homeostasis celular del hierro y están regulados por la disponibilidad de hierro y las ROS [431], sin embargo, todavía no se sabe cómo el sistema IRP-IRE contribuye a la acumulación de hierro durante la muerte celular ferroptótica. ACO1 es una proteína citosólica bifuncional que, además de controlar los niveles de hierro dentro de las células, cuando la concentración

de hierro en la célula es elevada funciona como una enzima esencial en el ciclo de Krebs uniéndose a un grupo 4Fe-4S y funcionando como aconitasa [25]. Las aconitasas son proteínas de hierro y azufre que funcionan para catalizar la conversión de citrato en isocitrato. Además, recientemente se ha descubierto que ACO1 puede unirse directamente al ADNmt y protegerlo de la acumulación excesiva de mutaciones puntuales y roturas [432, 433]. Se ha correlacionado la muerte por ferroptosis con una disminución en ACO1 y IRP2 [434] y la sobrecarga de hierro en el cerebro con la falta de IRP2 [435]. Por lo tanto, niveles bajos de las proteínas ACO1 y IRP2 pueden hacer que las células sean más sensibles a cambios en los niveles de hierro. En nuestros resultados hemos observado que el modelo de ratón NDUFS4-KO en una fase asintomática del LS presenta un aumento en la peroxidación lipídica, indicador de muerte por ferroptosis [243]. La ferroptosis puede ser causada por una alteración de la defensa redox por parte de GPX4 [241]. La inhibición del sistema Xc- compuesto por XCT y 4F2, conduce al agotamiento del GSH y, por tanto, GPX4 no puede activarse y ROS y peróxidos lipídicos se acumulan en la célula [387, 388]. Dicho de otra manera, el agotamiento de glutatión y alteraciones de la defensa redox de GPX4 incrementan la formación perjudicial de ROS lipídicas que se acumulan en la membrana de la célula y pueden conducir a la muerte por ferroptosis [241]. Los ratones NDUFS4-KO en la fase sintomática muestran una disminución de la expresión transcripcional de GPX4 y XCT, la principal vía de control de la ferroptosis [241, 246] y Fpn, involucrado en la exportación de hierro celular. Lo que puede provocar que el hierro se acumule en la célula de manera aberrante causando la muerte por ferroptosis [240, 436]. Por lo tanto, proponemos que el metabolismo del hierro alterado junto con un sistema de defensa contra la ferroptosis debilitado, puede contribuir a la fisiopatología de estos ratones NDUFS4-KO. En apoyo a esto, se ha visto que la restricción de hierro en la dieta de ratones NDUFS4-KO retrasa la aparición de síntomas neurológicos, mientras que la suplementación con hierro acelera los síntomas de degeneración cerebral [386]. Lo que sugiere que el metabolismo del hierro alterado durante el desarrollo puede estar involucrado en la fisiopatología del LS. Todos estos resultados, parecen indicar que la neurodegeneración observada en el LS [197] puede ser debida, en parte, a la muerte ferroptótica.

3. El CBD regula el metabolismo de la glucosa mediante la vía AKT en neuronas NDUFS4-KO.

En condiciones de una alta demanda energética las neuronas se adaptan estimulando la función glucolítica [437]. El piruvato generado en la glucólisis puede ser oxidado en la mitocondria o reducido a lactato y liberado al medio [305]. Las neuronas tienen una mayor tendencia a captar lactato gracias a la expresión de la isoforma MCT2 del transportador de lactato [304]. Por lo tanto, el lactato también puede ser captado del medio y convertido a piruvato para entrar al ciclo de Krebs y ser oxidado en la mitocondria [308].

Las neuronas dependen principalmente de la función de la OXPHOS para la producción de ATP [305]. El modelo de ratón KO para la subunidad NDUFS4 presenta perturbaciones en la función OXPHOS con deficiencias el complejo I mitocondrial [215-217]. En estos ratones NDUFS4-KO la PDH está más inactiva [424], por lo que la entrada de piruvato al ciclo de Krebs está comprometida. Todo esto conduce a alteraciones en la bioenergética mitocondrial con una disminución del MMP y niveles bajos de ATP y NAD⁺ [393, 394]. Y, para compensar el mal funcionamiento mitocondrial, se produce un aumento en el consumo de glucosa y la liberación de lactato. En los resultados presentados en esta tesis, mostramos que la falta de la subunidad mitocondrial NDUFS4 en neuronas cultivadas del tronco del encéfalo estimula el transporte de glucosa e incrementa la expresión del ratio LDHA/LDHB. La LDH es un homo-heterotetrámero compuesto de las subunidades LDHA y LDHB. El cambio en el ratio LDHA/LDHB en ratones NDUFS4-KO provoca una reducción en la expresión de la isoenzima LDH1 y un aumento en la isoenzima LDH4, isoenzima de la LDH con una mayor V_{máx} y por tanto una mayor capacidad de convertir el piruvato en lactato. Lo que parece indicar que estos ratones NDUFS4-KO tienen una mayor tendencia a convertir el piruvato en lactato. Además, la expresión transcripcional de diferentes transportes de lactato MCT's, analizados por qPCR, se encuentra alterada durante el desarrollo, mostrando un incremento en fases asintomáticas del LS y una disminución en las fases finales del LS.

El factor de transcripción HIF-1 es clave en la regulación del metabolismo de la glucosa [404, 405], y este presenta niveles elevados en el modelo de ratón NDUFS4-KO en una

fase asintomática del LS. HIF-1 en condiciones de hipoxia se ha visto que promueve la expresión de transportadores de la glucosa como GLUT1 y GLUT3 y, activa la expresión de enzimas como HK2, PFK1, PKM, PFKFB1-4 [404, 405], LDHA y MCT4 [406, 407]. Por lo que es probable que las neuronas con deficiencia en el complejo I mitocondrial, al tener la función OXPHOS disminuida no puedan generar suficiente ATP a partir del OXPHOS mitocondrial y, por tanto, se hayan adaptado a los requerimientos energéticos necesarios para la supervivencia neuronal, estimulando la vía glucolítica para abastecer a las células de la energía necesaria.

En general, las células que muestran una glucólisis mejorada y una fosforilación oxidativa alterada, sufren una reprogramación metabólica a largo plazo denominada efecto Warburg, en el que se produce un cambio energético de la OXPHOS a la glucólisis generando como producto final el lactato [438, 439]. El lactato desempeña un papel importante en diferentes procesos fisiológicos y patológicos [307]. La acumulación de lactato generada por la glucólisis se ha relacionado con acidosis láctica [307, 323], la cual es perjudicial para el organismo y está involucrada en la sintomatología del síndrome de Leigh, provocando hiperlacticoacidemia en sangre y/o líquido cefalorraquídeo [195]. La dieta cetogénica baja en carbohidratos se aplica como tratamiento para el LS, produciendo cuerpos cetónicos en lugar de glucosa como combustible celular [440]. Además, en el modelo de ratón NDUF54-KO la inhibición de la vía de señalización de mTOR, la cual provoca un cambio metabólico hacia el catabolismo de aminoácidos disminuyendo el metabolismo de la glucosa, se ha visto que mejora considerablemente la supervivencia y atenúa la progresión enfermedad [441]. Lo que es una evidencia que indica que la reducción de la glucólisis puede ser beneficiosa.

Recientemente se ha descrito una nueva modificación postraducciona en la que los residuos de lisina de histonas son lactilados, desempeñando un papel importante en la regulación transcripcional [310]. La modificación de histonas dependiente de lactato, enriquecida en los promotores de genes glucolíticos, promueve su transcripción aumentando así la actividad glucolítica [421]. Además, esta lactilación de histonas se ha relacionado con el aumento de la LDHA [310, 413]. Hemos observado que las neuronas NDUF54-KO cultivadas del tronco del encéfalo y del cerebelo presentan modificaciones postraduccionales asociadas a la glucólisis, con una H3 más lactilada, acorde con un

incremento en la liberación de lactato en el medio. La lactilación se ha visto implicada en los mecanismos de múltiples enfermedades [310, 313, 322]. Por ejemplo, la lactilación de la lisina 18 de la histona H3 (H3K18lac) se ha visto involucrada con la tumorigénesis del melanoma ocular [413]. Además, se ha identificado que la lactilación de la histona H1 aumenta en respuesta al estrés crónico [313].

La acumulación de evidencias sugiere que el CBD presenta un valor terapéutico para algunos trastornos neurodegenerativos que comparten características comunes con las MD, como el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la muerte neuronal [220, 442-445]. El CBD ha demostrado tener amplias propiedades terapéuticas y bajos efectos secundarios; posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, neuroprotectoras y anticonvulsivas [442-445]. Este cannabinoide exógeno ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de las convulsiones asociadas con síndromes pediátricos [446]. Nuestros colaboradores de la UAB del grupo del Dr. Albert Quintana (UAB) observaron que el CBD mejoró la sintomatología y aumentó la esperanza de vida en ratones NDUF54-KO. No obstante, el CBD actúa en diferentes vías [351]. En esta tesis se ha estudiado que moléculas señalizadoras alteradas en neuronas NDUF54-KO son normalizadas por el CBD, para poder identificar el mecanismo subyacente a los efectos beneficiosos del CBD y así poder proporcionar un tratamiento altamente específico. En nuestros resultados in vitro hemos visto que el CBD es capaz de reducir la liberación de lactato aumentada en neuronas NDUF54-KO y reducir la expresión del ratio LDHA / LDHB, y esto es suficiente para reducir la lactilación dependiente de lactato en neuronas KO. De acuerdo con esto, se ha descrito que el CBD al actuar sobre los receptores CB2 y A2A disminuye el flujo de LDH en cerebros inmaduros hipóxico-isquémicos [447]. Y, Jiménez-Blasco et al. descubrieron que la estimulación de mtCB1 en los astrocitos disminuye la producción de lactato [448]. Observamos que la inhibición de la LDH mediante oxamate recupera el MMP disminuido en neuronas cultivadas NDUF54-KO del tronco del encéfalo. Por lo tanto, estos resultados sugieren que es probable que el incremento de lactato observado en neuronas NDUF54-KO puede ser provocado por un mecanismo adaptativo que resulta patológico para el organismo, provocando que este se acumule en la célula de manera aberrante. Y, la disminución del flujo glucolítico mediante el CBD puede resultar un

mecanismo potencialmente beneficio para tratar el incremento de lactato aberrante en ratones NDUFS4-KO.

Hemos observado que la vía de transducción de señal AKT se encuentra hiperactivada en neuronas cultivadas con deficiencia en el complejo I mitocondrial. La vía de señalización AKT regula positivamente el metabolismo de la glucosa al estimular la señalización de mTOR [417, 418], lo que conduce a un mayor transporte de glucosa mediante la translocación de GLUT1 y GLUT3 a la superficie celular y estimula el metabolismo de la glucólisis mediante la activación de la PFK y HK [153, 415, 416]. Esto podría explicar el aumento del flujo glucolítico en neuronas cultivadas NDUFS4-KO. La vía de señalización AKT promueve la supervivencia celular ya que regula el crecimiento y el metabolismo celular [449-451]. No obstante, su hiperactivación puede provocar una acumulación excesiva de ROS e inducir la muerte celular, ya que, al inhibir la actividad de FOXO y estimular el metabolismo oxidativo, contribuye a la acumulación de ROS y hace que las células sean más susceptibles a la muerte celular mediada por ROS [452, 453]. El CBD se ha visto que es capaz de regular la vía AKT inactivando su señalización [419, 420]. Además, se ha relacionado la inactivación la vía de señalización AKT con los efectos antiinflamatorios mediados por el CBD [350] y, se ha visto que en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson confiere protección [454]. Nuestros resultados revelaron que la señalización de AKT en neuronas cultivadas del tronco del encéfalo NDUFS4-KO se vio reducida mediante el CBD. Y, de acuerdo con esto, el CBD normalizó el metabolismo de la glucosa en neuronas NDUFS4-KO reduciendo su captación. Por lo tanto, proponemos que el CBD bloquea el exceso de lactato observado en neuronas NDUFS4-KO posiblemente al bloquear la hiperactivación de AKT (Figura 87).

La activación de enzimas de la glicolisis favorece la vía glucolítica sobre las PPP [285]. La vía de las PPP es la principal fuente de poder reductor en forma de NADPH en las células [275], una de las principales fuentes de antioxidantes de la célula [285]. El CBD se ha visto que es capaz de potenciar las defensas antioxidantes estimulando la vía de las pentosas-fosfato [455]. Por lo tanto, proponemos que los efectos protectores del CBD podrían estar relacionados con la vía de las PPP. No obstante, debería hacerse un estudio más profundo para poder sacar conclusiones sólidas.

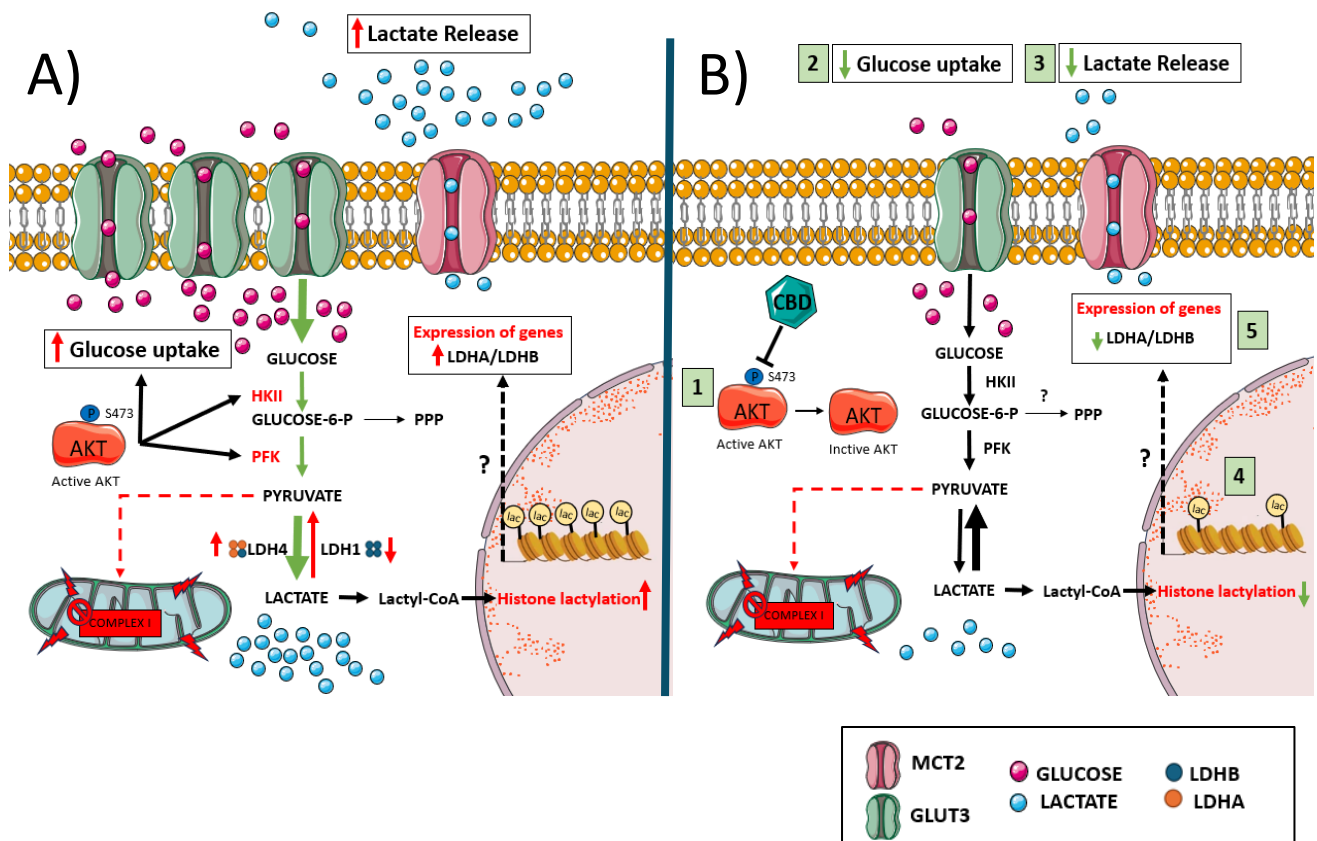


Figura 87: Posible modelo del mecanismo por el cual el CBD regula el metabolismo de la glucosa en neuronas NDUF54-KO. (A) Metabolismo de la glucosa propuesto en neuronas NDUF54-KO. Como consecuencia de AKT hiperactivado las neuronas KO presentan un aumento en el flujo glucolítico (Observado por un aumento en la captación de glucosa, en la expresión transcripcional de genes glucolíticos y en la expresión de la isoforma LDH4). Como resultado del flujo glucolítico se observa un exceso de lactato liberado en el medio extracelular y un aumento en la lactilación de histonas dependiente de lactato que, podría participar en la sobreexpresión del ratio LDHA/LDHB. **(B) Metabolismo de la glucosa propuesto en neuronas NDUF54-KO tratadas con CBD:** (1) El CBD inactiva AKT. (2) AKT inactivado reduce la captación de glucosa, (3) lo cual provoca una disminución del flujo glucolítico. (4) Como consecuencia de la disminución del flujo glucolítico disminuyen las modificaciones postraduccionales asociadas al aumento de la glucólisis (5) y estas modificaciones postraduccionales pueden estar relacionadas con las alteraciones en la expresión del ratio LDHA/LDHB observadas. Algunas de las figuras utilizadas en este esquema se han obtenido y modificado a partir de Smart Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

4. La RSG restaura los niveles de lactato y normaliza el MMP en neuronas NDUF54-KO.

Nuestros colaboradores observaron una regulación negativa de PPAR γ en el tronco del encéfalo de ratones NDUF54-KO y que, la mejora en la sintomatología observada en ratones tratados con CBD era parcialmente dependiente de PPAR γ , lo que sugiere que

esta puede ser una característica común en el SL. El factor de transcripción PPAR γ es clave en la función mitocondrial y las enfermedades neurológicas [158], así como un componente importante que media los efectos beneficiosos del CBD [456]. PPAR γ regula la expresión de genes implicados en el equilibrio redox, las respuestas inmunes, el metabolismo, la función mitocondrial y muchos otros procesos biológicos con una gran relevancia en las enfermedades relacionadas con el SNC [158]. En esta tesis se ha determinado que la actividad de PPAR γ está reducida en neuronas del tronco del encéfalo de ratones NDUFS4-KO. El PPAR γ es importante para la función mitocondrial [154-157] y su bloqueo supone consecuencias negativas para el organismo [457].

La actividad de PPAR γ está regulada por complejos correpresores o coactivadores y, para ser activados requieren de la unión de un ligando (hormonas, ácidos grasos naturales o derivados de ácidos grasos) [154]. Además, también pueden ser regulados por mediadores de la SRM, tales como los niveles de NAD $^{+}$ o de Ca $^{2+}$ citoplasmático [458, 459]. En ausencia de ligandos, estos factores de transcripción reclutan correpresores e histonas desacetilasas y enzimas asociadas a la modificación de la cromatina, silenciando la transcripción [154, 164]. Cuando se activan, los PPAR liberan los correpresores a los que estaban unidos y reclutan coactivadores que les permiten la heterodimerización a ciertos segmentos de ADN y la transactivación de promotores relacionados con elementos que responden a PPAR [154, 164]. Muchos de los genes regulados por los PPAR participan en la homeostasis energética, la absorción y el metabolismo de los lípidos y la glucosa en respuesta a diferentes condiciones de nutrientes [154, 164]. En nuestros resultados hemos visto que la activación de PPAR γ mediante la RSG recupera el MMP en cultivos neuronales NDUFS4-KO. Por tanto, en los ratones NDUFS4-KO, donde PPAR γ está desregulado, el efecto protector observado del CBD puede ser debido a un efecto sinérgico entre dos vías. La vía de AKT inducida por el CBD para la regulación del metabolismo de la glucosa y, la mejora en la bioenergética mitocondrial mediante la activación de PPAR γ . Para que el piruvato producido en la glucólisis sea metabolizado en las mitocondrias dado que la activación de PPAR γ puede regular la expresión de genes implicados en la OXPHOS [154, 164].

En nuestros resultados hemos visto que el la RSG es capaz de reducir la liberación de lactato y la lactilación dependiente de lactato en neuronas NDUFS4-KO cultivadas del

tronco del encéfalo. Sin embargo, en nuestros resultados no hemos observado cambios en la captación de glucosa de neuronas KO. Pese a que en la literatura se ha reportado que la RSG regula el metabolismo de la glucosa aumentando su consumo [460, 461]. Tal vez debido a que en estas neuronas el consumo de glucosa ya está aumentado, por lo que resultaría patológico aumentarlo todavía más. Además, la disminución en la liberación de lactato observada en neuronas KO tratadas con RSG parece ser independiente de la expresión transcripcional de LDHA, puesto que la RSG no modifica los niveles de expresión génica del ratio de LDHA/LDHB. De acuerdo con estos resultados, se ha reportado que la RSG está involucrada tanto en la producción como en la disminución de lactato sin modificar la actividad de LDHA [462, 463]. La reducción en la liberación de lactato podría deberse a un mayor consumo de piruvato por la mitocondria. Sin embargo, también se ha reportado que la RSG interactúa de manera independiente de PPAR γ con numerosas proteínas involucradas en la regulación de la glucólisis/gluconeogénesis [464]. Por lo que el mecanismo mediante el cual la RSG modifica la liberación de lactato parece ser por una vía diferente a la del CBD.

Como se ha comentado con anterioridad, la glucosa consumida por neuronas NDUF54-KO es principalmente metabolizada por la glucólisis para producir lactato, el cual se acumula y provoca modificaciones postraduccionales. En ratones NDUF54-KO la entrada de piruvato a la mitocondria está comprometida por acetilaciones que reducen la actividad de la PDH, la enzima encargada de descarboxilar el piruvato para permitir su entrada al ciclo de Krebs [424]. En los resultados se ha observado que la activación de Sirt3, una desacetilasa mitocondrial, recupera el MMP en neuronas del tronco del encéfalo NDUF54-KO. Los ratones NDUF54-KO presentan una despolarización parcial de la membrana mitocondrial y, un aumento de las ROS y de los niveles de NADPH [392-394]. Como se ha revelado en los resultados, la mejora en la función mitocondrial con la RSG recupera el MMP en neuronas KO. Por lo tanto, el redireccionamiento de sustratos a las mitocondrias puede mejorar la función mitocondrial y dirigir más piruvato a las mitocondrias para ser metabolizado en el ciclo de Krebs. Esto explicaría porque se observa una disminución tanto en la liberación de lactato como en la lactilación en neuronas NDUF54-KO independientemente de la captación de glucosa y la expresión del ratio LDHA/LDHB (Figura 88).

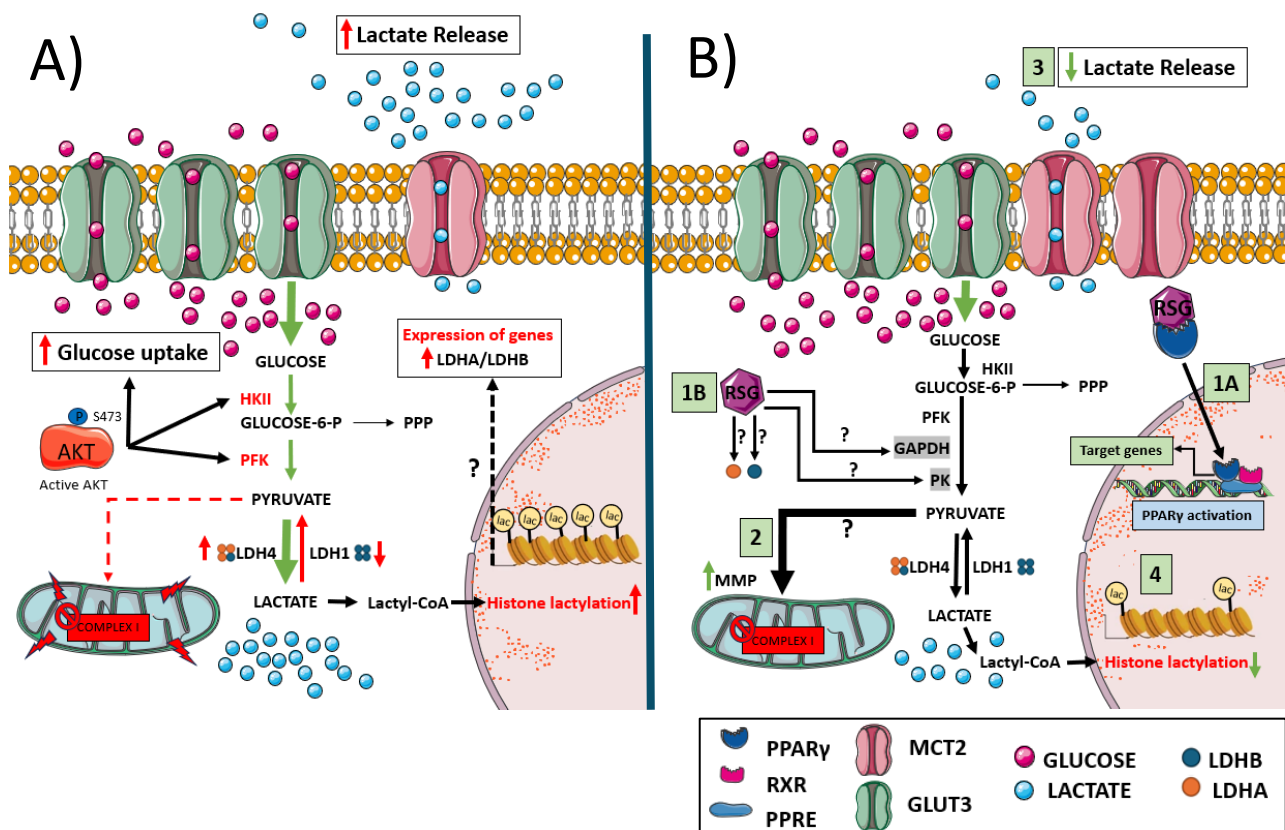


Figura 88: Posible modelo del mecanismo por el cual la RSG regula el metabolismo de la glucosa en neuronas NDUF54-KO. (A) Metabolismo de la glucosa propuesto en neuronas NDUF54-KO. Como consecuencia de la función alterada del complejo I mitocondrial, las neuronas KO presentan un aumento en el flujo glucolítico (Observado por un aumento en la captación de glucosa, en la expresión transcripcional de genes glucolíticos y en la expresión de la isoforma LDH4). Como resultado del flujo glucolítico se observa un exceso de lactato liberado en el medio extracelular y un aumento en la lactilación de histonas dependiente de lactato que, participa en la sobrerregulación del ratio LDHA/LDHB. **(B) Metabolismo de la glucosa propuesto en neuronas NDUF54-KO tratadas con RSG:** En este modelo planteamos dos posibilidades. **(1A)** La RSG activa PPAR γ y este activa la transcripción de genes implicados en la mejora de la bioenergética mitocondrial. **(1B)** La RSG interactúa con proteínas involucradas en la regulación de la glucólisis [464]. **(2)** Como consecuencia de esto, se observa una mejora en el MMP con el consiguiente aumento en el consumo de piruvato por las mitocondrias. **(3)** El aumento en el metabolismo mitocondrial provocado por un redireccionamiento de sustratos a las mitocondrias disminuye la producción de lactato y, por tanto, la liberación de lactato al medio extracelular. **(4)** Como consecuencia de la disminución del flujo glucolítico disminuyen las modificaciones postraduccionales asociadas al aumento de la glucólisis. Algunas de las figuras utilizadas en este esquema se han obtenido y modificado a partir de Smart Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

CONCLUSIONES

A raíz de los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo, se pudieron enunciar las siguientes conclusiones, en función de los objetivos propuestos inicialmente.

En el estudio de la regulación del metabolismo del hierro por la actividad sináptica y su papel en la bioenergética mitocondrial se concluye:

- 1. La actividad sináptica incrementa los niveles de Fe^{2+} intracelular.**
- 2. El aumento de los niveles de hierro intracelular en las neuronas activas participa en el incremento de la capacidad bioenergética.**
- 3. La actividad sináptica regula la expresión de genes del metabolismo del hierro de manera coordinada.**
- 4. La absorción de hierro mediada por la actividad sináptica juega un papel importante en la mejora de la bioenergética mitocondrial.**
- 5. La mejora en la bioenergética mitocondrial en neuronas activas es dependiente de la entrada de hierro a las mitocondrias por la proteína MFRN1.**
- 6. La actividad sináptica estimula la expresión del gen MFRN1 mediante el factor de transcripción CREB.**
- 7. La actividad sináptica induce la expresión de genes implicados en la defensa contra la ferroptosis y protege de la muerte celular por exceso de hierro.**

En el estudio del papel del metabolismo del hierro en la patofisiología del síndrome de Leigh se concluye:

- 8. La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial altera la expresión de genes y proteínas implicadas en el metabolismo del hierro.**
- 9. La falta de la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial reduce la expresión de genes implicados en la defensa contra la ferroptosis.**
- 10. La falta de la subunidad mitocondrial NDUF54 del complejo I mitocondrial contribuye a la peroxidación lipídica celular.**

En el estudio del mecanismo molecular por el que el cannabidiol mejora la patología del síndrome de Leigh se concluye:

- 11. Neuronas NDUF54-KO incrementan la liberación de lactato y promueven la captación de glucosa.**
- 12. Neuronas NDUF54-KO estimulan la expresión de genes implicados en el transporte y el metabolismo de la glucosa.**
- 13. La falta de la subunidad mitocondrial NDUF54 del complejo I mitocondrial incrementa la expresión del ratio de las subunidades LDHA/LDHB favoreciendo la expresión de la isoenzima LDH4.**
- 14. La falta de la subunidad mitocondrial NDUF54 del complejo I mitocondrial provoca un aumento en las modificaciones postraduccionales asociadas al aumento de la glucólisis.**
- 15. El CBD regula el metabolismo de la glucosa inhibiendo la vía AKT en neuronas NDUF54-KO.**
- 16. El CBD disminuye el exceso de lactato y la lactación en neuronas NDUF54-KO.**
- 17. La actividad de PPAR γ se ve reducida en neuronas NDUF54-KO.**
- 18. La RSG normaliza el MMP en neuronas NDUF54-KO.**
- 19. La RSG reduce la liberación de lactato y la lactación en neuronas NDUF54-KO.**
- 20. El redireccionamiento de sustratos a las mitocondrias de neuronas NDUF54-KO aumenta el MMP.**

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lynn Sagan (1967). «On the origin of mitosing cells». *J Theor Bio.* 14 (3): 255-274.
- [2] Margulis, Lynn (2003). Una revolución en la evolución.
- [3] Schimper AFW (1883). "Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper". *Bot. Zeitung* 41: 105–14, 121–31, 137–46, 153–62..
- [4] Kowallik, K. V., & Martin, W. F. (2021). The origin of symbiogenesis: An annotated English translation of Mereschkowsky's 1910 paper on the theory of two plasma lineages. *Bio Systems*, 199, 104281.
- [5] Portier P (1919). Les Symbiotes. *Nature* 103, 482–483.
- [6] Altmann R. (1890). *Die Elementarorganismen Und Ihre Beziehungen Zu Den Zellen*. Leipzig: Veit & comp., 145.
- [7] Rasmussen N. (1995). Mitochondrial structure and the practice of cell biology in the 1950s. *Journal of the history of biology*, 28(3), 381–429.
- [8] Vafai, S. B., & Mootha, V. K. (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature*, 491(7424), 374–383.
- [9] Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International journal of molecular medicine*, 44(1), 3–15.
- [10] Scheffler, I.E.. (2008). *Mitochondria*, Wiley-Liss.
- [11] Shoshan-Barmatz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., & Arbel, N. (2010). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular aspects of medicine*, 31(3), 227–285.
- [12] Pickles, S., Vigié, P., & Youle, R. J. (2018). Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Current biology : CB*, 28(4), R170–R185.
- [13] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*.
- [14] Friedman, J. R., & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505(7483), 335–343.
- [15] Chaban, Y., Boekema, E. J., & Dudkina, N. V. (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et biophysica acta*, 1837(4), 418–426.
- [16] Lewis, M. T., Kasper, J. D., Bazil, J. N., Frisbee, J. C., & Wiseman, R. W. (2019). Quantification of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Metabolic Disease:

Application to Type 2 Diabetes. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5271.

- [17] Picard, M., Shiriha, O. S., Gentil, B. J., & Burelle, Y. (2013). Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling?. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 304(6), R393–R406.
- [18] Huang, M. L., Lane, D. J., & Richardson, D. R. (2011). Mitochondrial mayhem: the mitochondrion as a modulator of iron metabolism and its role in disease. *Antioxidants & redox signaling*, 15(12), 3003–3019.
- [19] Shaw, G. C., Cope, J. J., Li, L., Corson, K., Hersey, C., Ackermann, G. E., Gwynn, B., Lambert, A. J., Wingert, R. A., Traver, D., Trede, N. S., Barut, B. A., Zhou, Y., Minet, E., Donovan, A., Brownlie, A., Balzan, R., Weiss, M. J., Peters, L. L., Kaplan, J., ... Paw, B. H. (2006). Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature*, 440(7080), 96–100.
- [20] Paradkar, P. N., Zumbrennen, K. B., Paw, B. H., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2009). Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Molecular and cellular biology*, 29(4), 1007–1016.
- [21] Ali, M. Y., Oliva, C. R., Flor, S., & Griguer, C. E. (2022). Mitoferrin, Cellular and Mitochondrial Iron Homeostasis. *Cells*, 11(21), 3464.
- [22] Mena, N. P., Urrutia, P. J., Lourido, F., Carrasco, C. M., & Núñez, M. T. (2015). Mitochondrial iron homeostasis and its dysfunctions in neurodegenerative disorders. *Mitochondrion*, 21, 92–105.
- [23] Baldauf, L., Endres, T., Scholz, J., Kirches, E., Ward, D. M., Lessmann, V., Borucki, K., & Mawrin, C. (2019). Mitoferrin-1 is required for brain energy metabolism and hippocampus-dependent memory. *Neuroscience letters*, 713, 134521.
- [24] Levi, S., Corsi, B., Bosisio, M., Invernizzi, R., Volz, A., Sanford, D., Arosio, P., & Drysdale, J. (2001). A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *The Journal of biological chemistry*, 276(27), 24437–24440.
- [25] Lane, D. J., Merlot, A. M., Huang, M. L., Bae, D. H., Jansson, P. J., Sahni, S., Kalinowski, D. S., & Richardson, D. R. (2015). Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1853(5), 1130–1144.

- [26] Santambrogio, P., Biasiotto, G., Sanvito, F., Olivieri, S., Arosio, P., & Levi, S. (2007). Mitochondrial ferritin expression in adult mouse tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 55(11), 1129–1137.
- [27] Gao, G., & Chang, Y. Z. (2014). Mitochondrial ferritin in the regulation of brain iron homeostasis and neurodegenerative diseases. *Frontiers in pharmacology*, 5, 19.
- [28] Gao, G., Zhang, N., Wang, Y. Q., Wu, Q., Yu, P., Shi, Z. H., Duan, X. L., Zhao, B. L., Wu, W. S., & Chang, Y. Z. (2017). Mitochondrial Ferritin Protects Hydrogen Peroxide-Induced Neuronal Cell Damage. *Aging and disease*, 8(4), 458–470.
- [29] Guernsey, D.L., Jiang, H., Campagna, D.R., Evans, S.C., Ferguson, M., Kellogg, M.D. (2009). Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat Genet*, 41((6)):651-3.
- [30] Bayev, a M., Khechaduri, A., Wu, R., Burke, M.A., Wasserstrom, J.A., Singh, N. (2013). ABCB10 Regulates Early Steps of Heme Synthesis. *Circ Res*, 113((3)):279-87.
- [31] Krishnamurthy, P.C., Du, G., Fukuda, Y., Sun, D., Sampath, J., Mercer, K.E. (2006). Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature*, 443((7111)):586-9.
- [32] Suchida, M., Emi, Y., Kida, Y., Sakaguchi, M. (2008). Human ABC transporter isoform B6 (ABCB6) localizes primarily in the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun*, 369((2)):369-75.
- [33] Paterson, J.K., Shukla, S., Black, C.M., Tachiwada, T., Garfield, S., Wincovitch, S. (2007). Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. *Biochemistry*, 46((33)):9443-52.
- [34] Kiss, K., Brozik, A., Kucsma, N., Toth, A., Gera, M., Berry, L. (2012). Shifting the paradigm: the putative mitochondrial protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes. *PLoS One*, 7((5)):e37378.
- [35] Villavicencio-Queijeiro, Alexa. (2012). La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD). *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 15(2), 116-132.

- [36] Mercurio, S., & Tolosano, E. (2014). Heme and erythropoiesis: more than a structural role. *Haematologica*, 99(6), 973–983.
- [37] Chiabrando, D., Marro, S., Mercurio, S., Giorgi, C., Petrillo, S., Vinchi, F. (2012). The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. *J Clin Invest*, 122((12)):4569-79.
- [38] Law, C.J., Maloney, P.C., Wang, D.N. (2008). Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol*, 62:289-305.
- [39] Pao, S.S., Paulsen, I.T., Saier, M.H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62((1)):1-34.
- [40] Poulos T. L. (2014). Heme enzyme structure and function. *Chemical reviews*, 114(7), 3919–3962.
- [41] Sassa, S., & Nagai, T. (1996). The role of heme in gene expression. *International journal of hematology*, 63(3), 167–178.
- [42] Tang, X.D., Xu, R., Reynolds, M.F., Garcia, M.L., Heinemann, S.H. & Hoshi, T. (2003). Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature*, 425, 531-535.
- [43] Rouault T. A. (2012). Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Disease models & mechanisms*, 5(2), 155–164.
- [44] Ye, H., & Rouault, T. A. (2010). Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry*, 49(24), 4945–4956.
- [45] Lill R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, 460(7257), 831–838.
- [46] Shi, R., Proteau, A., Villarroya, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Trempe, J. F., Matte, A., Armengod, M. E., & Cygler, M. (2010). Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS biology*, 8(4), e1000354.
- [47] De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., & Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 336–340.
- [48] Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., Bao, X. R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R. L., Kotliansky, V.,

- & Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 341–345.
- [49] Marchi, S., & Pinton, P. (2014). The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *The Journal of physiology*, 592(5), 829–839.
- [50] McCormack, J. G., & Denton, R. M. (1980). Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Properties of the Ca^{2+} -sensitive dehydrogenases within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat. *The Biochemical journal*, 190(1), 95–105.
- [51] Glancy, B., & Balaban, R. S. (2012). Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry*, 51(14), 2959–2973.
- [52] Sassano, M. L., van Vliet, A. R., & Agostinis, P. (2017). Mitochondria-Associated Membranes As Networking Platforms and Regulators of Cancer Cell Fate. *Frontiers in oncology*, 7, 174.
- [53] Glancy, B., Willis, W. T., Chess, D. J., & Balaban, R. S. (2013). Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria. *Biochemistry*, 52(16), 2793–2809.
- [54] Hunter, D. R., & Haworth, R. A. (1979). The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics*, 195(2), 453–459.
- [55] Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S., & Nicotera, P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *The Journal of experimental medicine*, 185(8), 1481–1486.
- [56] Di Lisa, F., Carpi, A., Giorgio, V., & Bernardi, P. (2011). The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(7), 1316–1322.
- [57] Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S. A., Petit, P. X., Mignotte, B., & Kroemer, G. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *The Journal of experimental medicine*, 182(2), 367–377.

- [58] Wang, Y., Xu, E., Musich, P. R., & Lin, F. (2019). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure. *CNS neuroscience & therapeutics*, 25(7), 816–824.
- [59] Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, 48(2), 158–167.
- [60] Murphy M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*, 417(1), 1–13.
- [61] Ribas, V., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in pharmacology*, 5, 151.
- [62] Orrenius S. (2004). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology letters*, 149(1-3), 19–23.
- [63] Ramonet, D., Perier, C., Recasens, A., Dehay, B., Bové, J., Costa, V., Scorrano, L., & Vila, M. (2013). Optic atrophy 1 mediates mitochondria remodeling and dopaminergic neurodegeneration linked to complex i deficiency. *Cell Death and Differentiation*, 20(1), 77-85.
- [64] Sousa, A. M. M., Meyer, K. A., Santpere, G., Gulden, F. O., & Sestan, N. (2017). Evolution of the Human Nervous System Function, Structure, and Development. *Cell*, 170(2), 226–247.
- [65] Harris, J. J., Jolivet, R., & Attwell, D. (2012). Synaptic energy use and supply. *Neuron*, 75(5), 762–777.
- [66] Agostini, M. et al. (2016) ‘Metabolic reprogramming during neuronal differentiation’, *Cell Death and Differentiation*, 23(9), pp. 1502–1514.
- [67] Zheng, X., Boyer, L., Jin, M., Mertens, J., Kim, Y., Ma, L., Ma, L., Hamm, M., Gage, F. H., & Hunter, T. (2016). Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *eLife*, 5, e13374.
- [68] Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y., & Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*, 119(6), 873–887.
- [69] Son, G., & Han, J. (2018). Roles of mitochondria in neuronal development. *BMB reports*, 51(11), 549–556.
- [70] Calkins, M. J., Manczak, M., Mao, P., Shirendeb, U., & Reddy, P. H. (2011). Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal

mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, 20(23), 4515–4529.

- [71] Lorenz, C., Lesimple, P., Bukowiecki, R., Zink, A., Inak, G., Mlody, B., Singh, M., Semtner, M., Mah, N., Auré, K., Leong, M., Zabiegajlov, O., Lyras, E. M., Pfiffer, V., Fauler, B., Eichhorst, J., Wiesner, B., Huebner, N., Priller, J., Mielke, T., ... Prigione, A. (2017). Human iPSC-Derived Neural Progenitors Are an Effective Drug Discovery Model for Neurological mtDNA Disorders. *Cell stem cell*, 20(5), 659–674.e9.
- [72] Mattson, M. P., & Partin, J. (1999). Evidence for mitochondrial control of neuronal polarity. *Journal of neuroscience research*, 56(1), 8–20.
- [73] Nguyen, H. T. N., Kato, H., Masuda, K., Yamaza, H., Hirofuji, Y., Sato, H., Pham, T. T. M., Takayama, F., Sakai, Y., Ohga, S., Taguchi, T., & Nonaka, K. (2018). Impaired neurite development associated with mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons differentiated from exfoliated deciduous tooth-derived pulp stem cells of children with autism spectrum disorder. *Biochemistry and biophysics reports*, 16, 24–31.
- [74] Büeler H. (2021). Mitochondrial and Autophagic Regulation of Adult Neurogenesis in the Healthy and Diseased Brain. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3342.
- [75] Shi, S. H., Hayashi, Y., Petralia, R. S., Zaman, S. H., Wenthold, R. J., Svoboda, K., & Malinow, R. (1999). Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5421), 1811–1816.
- [76] Hardingham, G.E., Arnold, F.J.L., Bading, H. (2001) Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* 4: 261 – 267 Trans. 2006;34(Pt 5):936–8.
- [77] Hardingham, G. E. and Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: Implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 682–696.
- [78] Cohen, S. and Greenberg, M. E. (2008) ‘Communication Between the Synapse and the Nucleus in Neuronal Development, Plasticity, and Disease’, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Annual Reviews, 24(1), pp. 183–209. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175235.

- [79] Redmond, L., Kashani, A. H. and Ghosh, A. (2002) 'Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription', *Neuron*. Elsevier, 34(6), pp. 999–1010. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00737-7.
- [80] Gonzalez, G. A. and Montminy, M. R. (1989) 'Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133', *Cell*. Elsevier, 59(4), pp. 675–680. doi: 10.1016/0092-8674(89)90013-5.
- [81] Dash, P. K. et al. (1991) 'cAMP response element-binding protein is activated by Ca²⁺/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 88(11), pp. 5061–5065. doi: 10.1073/pnas.88.11.5061.
- [82] Sheng, M., Thompson, M. A. and Greenberg, M. E. (1991) 'CREB: A Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 252(5011), pp. 1427–1430. doi: 10.1126/science.1646483.
- [83] Chrivia, J. C. et al. (1993) 'Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP', *Nature*. Nature Publishing Group, 365(6449), pp. 855–859. doi: 10.1038/365855a0.
- [84] Arias, J. et al. (1994) 'Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor', *Nature*. Nature Publishing Group, 370(6486), pp. 226–229. doi: 10.1038/370226a0.
- [85] Kwok, R. P. S. et al. (1994) 'Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB', *Nature*. Nature Publishing Group, 370(6486), pp. 223–226. doi: 10.1038/370223a0.
- [86] Ogryzko, V. V et al. (1996) 'The Transcriptional Coactivators p300 and CBP Are Histone Acetyltransferases', *Cell*. Cell Press, 87(5), pp. 953–959. doi: 10.1016/S0092-8674(00)82001-2.
- [87] Mantamadiotis, T. et al. (2002) 'Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 31(1), pp. 47–54. doi: 10.1038/ng882.
- [88] Segarra-Mondejar, M. et al. (2018) 'Synaptic activity-induced glycolysis facilitates membrane 232 lipid provision and neurite outgrowth', *The EMBO Journal*. EMBO Press, 37(9), p. e97368. doi: 10.15252/embj.201797368.

- [89] Scarpulla, R.C. (2002) Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1576, 1–14
- [90] Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., Walford, G. A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W. K., Hill, D. E., Vidal, M., Evans, J. G., Thorburn, D. R., Carr, S. A., & Mootha, V. K. (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134(1), 112–123.
- [91] Johnson, D. T., Harris, R. A., French, S., Blair, P. V., You, J., Bemis, K. G., Wang, M., & Balaban, R. S. (2007). Tissue heterogeneity of the mammalian mitochondrial proteome. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292(2), C689–C697.
- [92] Wallace D. C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual review of genetics*, 39, 359–407.
- [93] Hunt, R. J., & Bateman, J. M. (2018). Mitochondrial retrograde signaling in the nervous system. *FEBS letters*, 592(5), 663–678.
- [94] Boland, M. L., Chourasia, A. H., & Macleod, K. F. (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Frontiers in oncology*, 3, 292.
- [95] Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829–839.
- [96] Castellanos, E., & Lanning, N. J. (2019). Phosphorylation of OXPHOS Machinery Subunits: Functional Implications in Cell Biology and Disease. *The Yale journal of biology and medicine*, 92(3), 523–531.
- [97] Liao X, Butow RA (1993) RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* 72(1):61–71.
- [98] Granat, L., Hunt, R. J., & Bateman, J. M. (2020). Mitochondrial retrograde signalling in neurological disease. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 375(1801), 20190415.
- [99] Arnould, T., Michel, S., & Renard, P. (2015). Mitochondria Retrograde Signaling and the UPR mt: Where Are We in Mammals?. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 18224–18251.

- [100] Roca-Portoles, A., & Tait, S. W. G. (2021). Mitochondrial quality control: from molecule to organelle. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 78(8), 3853–3866.
- [101] Rowland, A. A., & Voeltz, G. K. (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(10), 607–625.
- [102] Carreras-Sureda, A., Pihán, P., & Hetz, C. (2017). The Unfolded Protein Response: At the Intersection between Endoplasmic Reticulum Function and Mitochondrial Bioenergetics. *Frontiers in oncology*, 7, 55.
- [103] Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y. H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C. L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M. S., Sartor, M. A., & Kaufman, R. J. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature cell biology*, 15(5), 481–490.
- [104] Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(9), 566–578.
- [105] Butow, R. A., & Avadhani, N. G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Molecular cell*, 14(1), 1–15.
- [106] Jude, J. A., Wylam, M. E., Walseth, T. F., & Kannan, M. S. (2008). Calcium signaling in airway smooth muscle. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(1), 15–22.
- [107] Acin-Perez, R., Gatti, D. L., Bai, Y., & Manfredi, G. (2011). Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: coupled mechanisms of energy metabolism regulation. *Cell metabolism*, 13(6), 712–719.
- [108] Schreiber, T. B., Mäusbacher, N., Breitkopf, S. B., Grundner-Culemann, K., & Daub, H. (2008). Quantitative phosphoproteomics--an emerging key technology in signal-transduction research. *Proteomics*, 8(21), 4416–4432.
- [109] Hanoune, J., & Defer, N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41, 145–174.
- [110] Hardie, D. G., Carling, D., & Gamblin, S. J. (2011). AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP?. *Trends in biochemical sciences*, 36(9), 470–477.

- [111] Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483–495.
- [112] Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., & Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458(7241), 1056–1060.
- [113] Houtkooper, R. H., Cantó, C., Wanders, R. J., & Auwerx, J. (2010). The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrine reviews*, 31(2), 194–223.
- [114] Langelier, M. F., Eisemann, T., Riccio, A. A., & Pascal, J. M. (2018). PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification. *Current opinion in structural biology*, 53, 187–198.
- [115] Frye, R.A. (1999) Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 273–279
- [116] Frye, R.A. (2000) Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 793–798
- [117] Vaquero, A., Sternglanz, R., & Reinberg, D. (2007). NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene*, 26(37), 5505–5520.
- [118] Vaquero, A., & Reinberg, D. (2009). Calorie restriction and the exercise of chromatin. *Genes & development*, 23(16), 1849–1869.
- [119] Zhang, J., Xiang, H., Liu, J., Chen, Y., He, R. R., & Liu, B. (2020). Mitochondrial Sirtuin 3: New emerging biological function and therapeutic target. *Theranostics*, 10(18), 8315–8342.
- [120] Polevoda, B., & Sherman, F. (2002). The diversity of acetylated proteins. *Genome biology*, 3(5), reviews0006.
- [121] Parodi-Rullán, R. M., Chapa-Dubocq, X. R., & Javadov, S. (2018). Acetylation of Mitochondrial Proteins in the Heart: The Role of SIRT3. *Frontiers in physiology*, 9, 1094.
- [122] Matsushima, S., & Sadoshima, J. (2015). The role of sirtuins in cardiac disease. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 309(9), H1375–H1389.

- [123] Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S. M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., ... Guan, K. L. (2010). Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5968), 1000–1004.
- [124] Tao, R., Vassilopoulos, A., Parisiadou, L., Yan, Y., & Gius, D. (2014). Regulation of MnSOD enzymatic activity by Sirt3 connects the mitochondrial acetylome signaling networks to aging and carcinogenesis. *Antioxidants & redox signaling*, 20(10), 1646–1654.
- [125] Sundaresan, N. R., Gupta, M., Kim, G., Rajamohan, S. B., Isbatan, A., & Gupta, M. P. (2009). Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(9), 2758–2771
- [126] Merksamer, P. I., Liu, Y., He, W., Hirschey, M. D., Chen, D., & Verdin, E. (2013). The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging*, 5(3), 144–150.
- [127] Chen, Y., Fu, L. L., Wen, X., Wang, X. Y., Liu, J., Cheng, Y., & Huang, J. (2014). Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell death & disease*, 5(2), e1047.
- [128] Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J. T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S. H., Mostoslavsky, R., Alt, F. W., Wu, Z., & Puigserver, P. (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *The EMBO journal*, 26(7), 1913–1923.
- [129] Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., & Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*, 434(7029), 113–118.
- [130] Fernandez-Marcos, P. J., & Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *The American journal of clinical nutrition*, 93(4), 884S–90.
- [131] Sidorova-Darmos, E., Sommer, R., & Eubanks, J. H. (2018). The Role of SIRT3 in the Brain Under Physiological and Pathological Conditions. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 196.
- [132] Lu, C., & Thompson, C. B. (2012). Metabolic regulation of epigenetics. *Cell metabolism*, 16(1), 9–17.

- [133] Losman, J. A., & Kaelin, W. G., Jr (2013). What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes & development*, 27(8), 836–852.
- [134] Gottlieb, E., & Tomlinson, I. P. (2005). Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nature reviews. Cancer*, 5(11), 857–866.
- [135] Kaelin, W. G., Jr, & McKnight, S. L. (2013). Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell*, 153(1), 56–69.
- [136] Sullivan, L. B., Martinez-Garcia, E., Nguyen, H., Mullen, A. R., Dufour, E., Sudarshan, S., Licht, J. D., Deberardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2013). The proto-oncometabolite fumarate binds glutathione to amplify ROS-dependent signaling. *Molecular cell*, 51(2), 236–248.
- [137] Madiraju, P., Pande, S.V., Prentki, M., Madiraju, S.R. (2009). Mitochondrial acetylcarnitine provides acetyl groups for nuclear histone acetylation. *Epigenetics*, 4: 399 –403.
- [138] Spange, S., Wagner, T., Heinzel, T., & Krämer, O. H. (2009). Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(1), 185–198.
- [139] Yang, X. J., & Seto, E. (2008). Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Molecular cell*, 31(4), 449–461.
- [140] Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in biochemical sciences*, 35(9), 505–513.
- [141] Tonks N. K. (2005). Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell*, 121(5), 667–670.
- [142] Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., & Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*, 120(5), 649–661.
- [143] Lee, S. R., Yang, K. S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., & Rhee, S. G. (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *The Journal of biological chemistry*, 277(23), 20336–20342.
- [144] Guzy, R. D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K. D., Simon, M. C., Hammerling, U., & Schumacker, P. T. (2005). Mitochondrial complex III is required

for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell metabolism*, 1(6), 401–408.

- [145] Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M., & Schumacker, P. T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *The Journal of biological chemistry*, 275(33), 25130–25138.
- [146] Lee, S. J., Hwang, A. B., & Kenyon, C. (2010). Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Current biology : CB*, 20(23), 2131–2136.
- [147] Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*, 3(3), 177–185.
- [148] Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L., & Denko, N. C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell metabolism*, 3(3), 187–197.
- [149] Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell research*, 21(1), 103–115.
- [150] Ma Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, 401–426.
- [151] Papa, L., & Germain, D. (2011). Estrogen receptor mediates a distinct mitochondrial unfolded protein response. *Journal of cell science*, 124(Pt 9), 1396–1402.
- [152] Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261–1274.
- [153] Robey, R. B., & Hay, N. (2009). Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Seminars in cancer biology*, 19(1), 25–31.
- [154] Christofides, A., Konstantinidou, E., Jani, C., & Boussiotis, V. A. (2021). The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism: clinical and experimental*, 114, 154338.

- [155] Rodríguez Pérez, J. C., Rodríguez Esparragón, F., & Nóvoa, J. (2007). PPAR-gamma, hipertensión arterial y riñón [PPAR-gamma, arterial hypertension and the kidney]. *Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*, 27(1), 6–11.
- [156] Holm, L. J., Mønsted, M. Ø., Haupt-Jorgensen, M., & Buschard, K. (2020). PPARs and the Development of Type 1 Diabetes. *PPAR research*, 2020, 6198628.
- [157] Wagner, E. R., He, B. C., Chen, L., Zuo, G. W., Zhang, W., Shi, Q., Luo, Q., Luo, X., Liu, B., Luo, J., Rastegar, F., He, C. J., Hu, Y., Boody, B., Luu, H. H., He, T. C., Deng, Z. L., & Haydon, R. C. (2010). Therapeutic Implications of PPARgamma in Human Osteosarcoma. *PPAR research*, 2010, 956427.
- [158] Corona, J. C., & Duchen, M. R. (2016). PPAR γ as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free radical biology & medicine*, 100, 153–163.
- [159] Kota, B. P., Huang, T. H., & Roufogalis, B. D. (2005). An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological research*, 51(2), 85–94.
- [160] Werman, A., Hollenberg, A., Solanes, G., Bjorbaek, C., Vidal-Puig, A. J., & Flier, J. S. (1997). Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *The Journal of biological chemistry*, 272(32), 20230–20235.
- [161] Nielsen, R., Grøntved, L., Stunnenberg, H. G., & Mandrup, S. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor subtype- and cell-type-specific activation of genomic target genes upon adenoviral transgene delivery. *Molecular and cellular biology*, 26(15), 5698–5714.
- [162] Rigano, D., Sirignano, C., & Taglialatela-Scafati, O. (2017). The potential of natural products for targeting PPAR α . *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 7(4), 427–438.
- [163] Han, L., Shen, W. J., Bittner, S., Kraemer, F. B., & Azhar, S. (2017). PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- α . *Future cardiology*, 13(3), 259–278.
- [164] Moreno, M., Lombardi, A., Silvestri, E., Senese, R., Cioffi, F., Goglia, F., Lanni, A., & de Lange, P. (2010). PPARs: Nuclear Receptors Controlled by, and Controlling, Nutrient Handling through Nuclear and Cytosolic Signaling. *PPAR research*, 2010, 435689.

- [165] Ricote, M., & Glass, C. K. (2007). PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochimica et biophysica acta*, 1771(8), 926–935.
- [166] Torchia, J., Glass, C., & Rosenfeld, M. G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Current opinion in cell biology*, 10(3), 373–383.
- [167] Yessoufou, A., & Wahli, W. (2010). Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss medical weekly*, 140, w13071.
- [168] Rangwala, S. M., Rhoades, B., Shapiro, J. S., Rich, A. S., Kim, J. K., Shulman, G. I., Kaestner, K. H., & Lazar, M. A. (2003). Genetic modulation of PPARgamma phosphorylation regulates insulin sensitivity. *Developmental cell*, 5(4), 657–663.
- [169] Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T. P., & Rastinejad, F. (2008). Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, 456(7220), 350–356.
- [170] Choi, J. H., Banks, A. S., Estall, J. L., Kajimura, S., Boström, P., Laznik, D., Ruas, J. L., Chalmers, M. J., Kamenecka, T. M., Blüher, M., Griffin, P. R., & Spiegelman, B. M. (2010). Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. *Nature*, 466(7305), 451–456.
- [171] Uittenbogaard, M., & Chiaramello, A. (2014). Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. *Current pharmaceutical design*, 20(35), 5574–5593.
- [172] Li, P. A., Hou, X., & Hao, S. (2017). Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration. *Journal of neuroscience research*, 95(10), 2025–2029.
- [173] Diaz, F., & Moraes, C. T. (2008). Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell calcium*, 44(1), 24–35.
- [174] Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in biochemistry*, 47, 69–84.
- [175] Fontecha-Barriuso, M., Martin-Sanchez, D., Martinez-Moreno, J. M., Monsalve, M., Ramos, A. M., Sanchez-Niño, M. D., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A., & Sanz, A. B. (2020). The Role of PGC-1 α and Mitochondrial Biogenesis in Kidney Diseases. *Biomolecules*, 10(2), 347.

- [176] Ventura-Clapier, R., Garnier, A., & Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovascular research*, 79(2), 208–217.
- [177] Schaefer, A. M., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., & Chinnery, P. F. (2004). The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochimica et biophysica acta*, 1659(2-3), 115–120.
- [178] Hirano, M., Emmanuele, V., & Quinzii, C. M. (2018). Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays in biochemistry*, 62(3), 467–481.
- [179] Chinnery, P. F., Thorburn, D. R., Samuels, D. C., White, S. L., Dahl, H. M., Turnbull, D. M., Lightowlers, R. N., & Howell, N. (2000). The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both?. *Trends in genetics : TIG*, 16(11), 500–505.
- [180] Rebolledo-Jaramillo, B., Su, M. S., Stoler, N., McElhoe, J. A., Dickins, B., Blankenberg, D., Korneliussen, T. S., Chiaromonte, F., Nielsen, R., Holland, M. M., Paul, I. M., Nekrutenko, A., & Makova, K. D. (2014). Maternal age effect and severe germ-line bottleneck in the inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(43), 15474–15479.
- [181] Hauswirth, W. W., & Laipis, P. J. (1982). Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(15), 4686–4690.
- [182] Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D. R., Zeviani, M., & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16080.
- [183] Carroll, C. J., Brilhante, V., & Suomalainen, A. (2014). Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. *British journal of pharmacology*, 171(8), 1837–1853.
- [184] Jackson, M., Marks, L., May, G. H. W., & Wilson, J. B. (2018). The genetic basis of disease. *Essays in biochemistry*, 62(5), 643–723.
- [185] Horvath, R., Kemp, J. P., Tuppen, H. A., Hudson, G., Oldfors, A., Marie, S. K., Moslemi, A. R., Servidei, S., Holme, E., Shanske, S., Kollberg, G., Jayakar, P., Pyle, A., Marks, H. M., Holinski-Feder, E., Scavina, M., Walter, M. C., Coku, J., Günther-Scholz, A., Smith, P. M., DiMauro, S. (2009). Molecular basis of infantile reversible

cytochrome c oxidase deficiency myopathy. *Brain : a journal of neurology*, 132(Pt 11), 3165–3174.

- [186] McFarland, R., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2010). A neurological perspective on mitochondrial disease. *The Lancet. Neurology*, 9(8), 829–840.
- [187] Lake, N. J., Compton, A. G., Rahman, S., & Thorburn, D. R. (2016). Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Annals of neurology*, 79(2), 190–203.
- [188] Rahman S. (2020). Mitochondrial disease in children. *Journal of internal medicine*, 287(6), 609–633.
- [189] LEIGH D. (1951). Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 14(3), 216–221.
- [190] Rahman, S., Blok, R. B., Dahl, H. H., Danks, D. M., Kirby, D. M., Chow, C. W., Christodoulou, J., & Thorburn, D. R. (1996). Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annals of neurology*, 39(3), 343–351.
- [191] Gerards, M., Sallevelt, S. C., & Smeets, H. J. (2016). Leigh syndrome: Resolving the clinical and genetic heterogeneity paves the way for treatment options. *Molecular genetics and metabolism*, 117(3), 300–312.
- [192] Finsterer J. (2008). Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatric neurology*, 39(4), 223–235.
- [193] Rahman S. (2023). Leigh syndrome. *Handbook of clinical neurology*, 194, 43–63.
- [194] Bakare, A. B., Lesnefsky, E. J., & Iyer, S. (2021). Leigh Syndrome: A Tale of Two Genomes. *Frontiers in physiology*, 12, 693734.
- [195] Schubert Baldo, M., & Vilarinho, L. (2020). Molecular basis of Leigh syndrome: a current look. *Orphanet journal of rare diseases*, 15(1), 31.
- [196] McKelvie, P., Infeld, B., Marotta, R., Chin, J., Thorburn, D., & Collins, S. (2012). Late-adult onset Leigh syndrome. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 19(2), 195–202.
- [197] Lake, N. J., Bird, M. J., Isohanni, P., & Paetau, A. (2015). Leigh syndrome: neuropathology and pathogenesis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 74(6), 482–492.
- [198] Ma, Y. Y., Wu, T. F., Liu, Y. P., Wang, Q., Song, J. Q., Li, X. Y., Shi, X. Y., Zhang, W. N., Zhao, M., Hu, L. Y., Yang, Y. L., & Zou, L. P. (2013). Genetic and biochemical findings

in Chinese children with Leigh syndrome. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 20(11), 1591–1594.

- [199] Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M. H., Patlak, C. S., Pettigrew, K. D., Sakurada, O., & Shinohara, M. (1977). The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of neurochemistry*, 28(5), 897–916.
- [200] Chugani, H. T., Phelps, M. E., & Mazziotta, J. C. (1987). Positron emission tomography study of human brain functional development. *Annals of neurology*, 22(4), 487–497.
- [201] Kinnala, A., Suhonen-Polvi, H., Aärimaa, T., Kero, P., Korvenranta, H., Ruotsalainen, U., Bergman, J., Haaparanta, M., Solin, O., Nuutila, P., & Wegelius, U. (1996). Cerebral metabolic rate for glucose during the first six months of life: an FDG positron emission tomography study. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*, 74(3), F153–F157.
- [202] Chugani, H. T., & Phelps, M. E. (1986). Maturational changes in cerebral function in infants determined by 18FDG positron emission tomography. *Science (New York, N.Y.)*, 231(4740), 840–843.
- [203] Anzil, A. P., Weindl, A., & Struppler, A. (1981). Ultrastructure of a cerebral white matter lesion in a 41-year-old man with Leigh's encephalomyelopathy (LEM). *Acta neuropathologica. Supplementum*, 7, 233–238.
- [204] Arai, J., & Tanabe, Y. (2000). Leigh syndrome: serial MR imaging and clinical follow-up. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 21(8), 1502–1509.
- [205] Cavanagh, J. B., & Harding, B. N. (1994). Pathogenic factors underlying the lesions in Leigh's disease. Tissue responses to cellular energy deprivation and their clinico-pathological consequences. *Brain : a journal of neurology*, 117 (Pt 6), 1357–1376.
- [206] Montpetit, V. J., Andermann, F., Carpenter, S., Fawcett, J. S., Zborowska-Sluis, D., & Giberson, H. R. (1971). Subacute necrotizing encephalomyelopathy. A review and a study of two families. *Brain : a journal of neurology*, 94(1), 1–30.
- [207] Baertling, F., Klee, D., Haack, T. B., Prokisch, H., Meitinger, T., Mayatepek, E., Schaper, J., & Distelmaier, F. (2016). The many faces of paediatric mitochondrial

disease on neuroimaging. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 32(11), 2077–2083.

- [208] van Erven, P. M., Cillessen, J. P., Eekhoff, E. M., Gabreëls, F. J., Doesburg, W. H., Lemmens, W. A., Slooff, J. L., Renier, W. O., & Ruitenbeek, W. (1987). Leigh syndrome, a mitochondrial encephalo(myo)pathy. A review of the literature. *Clinical neurology and neurosurgery*, 89(4), 217–230.
- [209] Sofroniew M. V. (2005). Reactive astrocytes in neural repair and protection. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 11(5), 400–407.
- [210] Murayama, K., Shimura, M., Liu, Z., Okazaki, Y., & Ohtake, A. (2019). Recent topics: the diagnosis, molecular genesis, and treatment of mitochondrial diseases. *Journal of human genetics*, 64(2), 113–125.
- [211] DiMauro, S., & Schon, E. A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *The New England journal of medicine*, 348(26), 2656–2668.
- [212] Martinelli, D., Catteruccia, M., Piemonte, F., Pastore, A., Tozzi, G., Dionisi-Vici, C., Pontrelli, G., Corsetti, T., Livadiotti, S., Kheifets, V., Hinman, A., Shrader, W. D., Thoolen, M., Klein, M. B., Bertini, E., & Miller, G. (2012). EPI-743 reverses the progression of the pediatric mitochondrial disease--genetically defined Leigh Syndrome. *Molecular genetics and metabolism*, 107(3), 383–388.
- [213] Zhang, J., Liu, H., Luo, S., Lu, Z., Chávez-Badiola, A., Liu, Z., Yang, M., Merhi, Z., Silber, S. J., Munné, S., Konstantinidis, M., Wells, D., Tang, J. J., & Huang, T. (2017). Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reproductive biomedicine online*, 34(4), 361–368.
- [214] Tanaka, M., Borgeld, H. J., Zhang, J., Muramatsu, S., Gong, J. S., Yoneda, M., Maruyama, W., Naoi, M., Ibi, T., Sahashi, K., Shamoto, M., Fuku, N., Kurata, M., Yamada, Y., Nishizawa, K., Akao, Y., Ohishi, N., Miyabayashi, S., Umemoto, H., Muramatsu, T., Yagi, K. (2002). Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria. *Journal of biomedical science*, 9(6 Pt 1), 534–541.
- [215] Quintana, A., Kruse, S. E., Kapur, R. P., Sanz, E., & Palmiter, R. D. (2010). Complex I deficiency due to loss of Ndufs4 in the brain results in progressive encephalopathy

resembling Leigh syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 10996–11001.

- [216] Quintana, A., Zanella, S., Koch, H., Kruse, S. E., Lee, D., Ramirez, J. M., & Palmiter, R. D. (2012). Fatal breathing dysfunction in a mouse model of Leigh syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), 2359–2368.
- [217] Kruse, S. E., Watt, W. C., Marcinek, D. J., Kapur, R. P., Schenkman, K. A., & Palmiter, R. D. (2008). Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell metabolism*, 7(4), 312–320.
- [218] Dubinsky J. M. (2017). Towards an Understanding of Energy Impairment in Huntington's Disease Brain. *Journal of Huntington's disease*, 6(4), 267–302.
- [219] DiMauro, S., Schon, E. A., Carelli, V., & Hirano, M. (2013). The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nature reviews. Neurology*, 9(8), 429–444.
- [220] Boczonadi, V., & Horvath, R. (2014). Mitochondria: impaired mitochondrial translation in human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 48(100), 77–84.
- [221] Bolea, I., Gella, A., Sanz, E., Prada-Dacasa, P., Menardy, F., Bard, A. M., Machuca-Márquez, P., Eraso-Pichot, A., Mòdol-Caballero, G., Navarro, X., Kalume, F., & Quintana, A. (2019). Defined neuronal populations drive fatal phenotype in a mouse model of Leigh syndrome. *eLife*, 8, e47163.
- [222] Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 136–147.
- [223] Eaton, J. W., & Qian, M. (2002). Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free radical biology & medicine*, 32(9), 833–840.
- [224] Richardson, D. R., Lane, D. J., Becker, E. M., Huang, M. L., Whitnall, M., Suryo Rahmanto, Y., Sheftel, A. D., & Ponka, P. (2010). Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 10775–10782.
- [225] Lozoff, B., Jimenez, E., Hagen, J., Mollen, E., & Wolf, A. W. (2000). Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics*, 105(4), E51.

- [226] Zecca, L., Youdim, M. B., Riederer, P., Connor, J. R., & Crichton, R. R. (2004). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(11), 863–873.
- [227] Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L., & Hediger, M. A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388(6641), 482–488.
- [228] Milman N. T. (2020). A Review of Nutrients and Compounds, Which Promote or Inhibit Intestinal Iron Absorption: Making a Platform for Dietary Measures That Can Reduce Iron Uptake in Patients with Genetic Haemochromatosis. *Journal of nutrition and metabolism*, 2020, 7373498.
- [229] Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., Kang, R., & Tang, D. (2016). Ferroptosis: process and function. *Cell death and differentiation*, 23(3), 369–379.
- [230] Chen, H., Attieh, Z. K., Su, T., Syed, B. A., Gao, H., Alaeddine, R. M., Fox, T. C., Usta, J., Naylor, C. E., Evans, R. W., McKie, A. T., Anderson, G. J., & Vulpe, C. D. (2004). Hephaestin is a ferroxidase that maintains partial activity in sex-linked anemia mice. *Blood*, 103(10), 3933–3939.
- [231] Nishizawa, H., Matsumoto, M., Shindo, T., Saigusa, D., Kato, H., Suzuki, K., Sato, M., Ishii, Y., Shimokawa, H., & Igarashi, K. (2020). Ferroptosis is controlled by the coordinated transcriptional regulation of glutathione and labile iron metabolism by the transcription factor BACH1. *The Journal of biological chemistry*, 295(1), 69–82.
- [232] Lu, L. N., Qian, Z. M., Wu, K. C., Yung, W. H., & Ke, Y. (2017). Expression of Iron Transporters and Pathological Hallmarks of Parkinson's and Alzheimer's Diseases in the Brain of Young, Adult, and Aged Rats. *Molecular neurobiology*, 54(7), 5213–5224.
- [233] Hare, D., Ayton, S., Bush, A., & Lei, P. (2013). A delicate balance: Iron metabolism and diseases of the brain. *Frontiers in aging neuroscience*, 5, 34.
- [234] Stanwood, G. D., Leitch, D. B., Savchenko, V., Wu, J., Fitsanakis, V. A., Anderson, D. J., Stankowski, J. N., Aschner, M., & McLaughlin, B. (2009). Manganese exposure is cytotoxic and alters dopaminergic and GABAergic neurons within the basal ganglia. *Journal of neurochemistry*, 110(1), 378–389.

- [235] Burkhart, A., Skjørringe, T., Johnsen, K. B., Siupka, P., Thomsen, L. B., Nielsen, M. S., Thomsen, L. L., & Moos, T. (2016). Expression of Iron-Related Proteins at the Neurovascular Unit Supports Reduction and Reoxidation of Iron for Transport Through the Blood-Brain Barrier. *Molecular neurobiology*, 53(10), 7237–7253.
- [236] Rao, S. S., & Adlard, P. A. (2018). Untangling Tau and Iron: Exploring the Interaction Between Iron and Tau in Neurodegeneration. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 276.
- [237] Andrews N. C. (1999). The iron transporter DMT1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 31(10), 991–994.
- [238] Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T., & Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5704), 2090–2093.
- [239] Qiu, L., Ge, L., & Hu, Q. (2020). Dexmedetomidine Protects SK-N-SH Nerve Cells from Oxidative Injury by Maintaining Iron Homeostasis. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 43(3), 424–431.
- [240] Djulbegovic, M. B., & Uversky, V. N. (2019). Ferroptosis - An iron- and disorder-dependent programmed cell death. *International journal of biological macromolecules*, 135, 1052–1069.
- [241] Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., 3rd, & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060–1072.
- [242] Devos, D., Cabantchik, Z. I., Moreau, C., Danel, V., Mahoney-Sanchez, L., Bouchaoui, H., Gouel, F., Rolland, A. S., Duce, J. A., Devedjian, J. C., & FAIRPARK-II and FAIRALS-II studygroups (2020). Conservative iron chelation for neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 127(2), 189–203.
- [243] Capelletti, M. M., Manceau, H., Puy, H., & Peoc'h, K. (2020). Ferroptosis in Liver Diseases: An Overview. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 4908.

- [244] Catalá A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and physics of lipids*, 157(1), 1–11.
- [245] Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 360438.
- [246] Koppula, P., Zhang, Y., Zhuang, L., & Gan, B. (2018). Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. *Cancer communications (London, England)*, 38(1), 12.
- [247] Speer, R. E., Karuppagounder, S. S., Basso, M., Sleiman, S. F., Kumar, A., Brand, D., Smirnova, N., Gazaryan, I., Khim, S. J., & Ratan, R. R. (2013). Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases as targets for neuroprotection by "antioxidant" metal chelators: From ferroptosis to stroke. *Free radical biology & medicine*, 62, 26–36.
- [248] Chen, L., Na, R., Gu, M., Richardson, A., & Ran, Q. (2008). Lipid peroxidation up-regulates BACE1 expression in vivo: a possible early event of amyloidogenesis in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 107(1), 197–207.
- [249] Markesbery, W. R., & Lovell, M. A. (1998). Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 19(1), 33–36.
- [250] Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E. R., & Mizuno, Y. (1996). Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(7), 2696–2701.
- [251] Hauser, D. N., Dukes, A. A., Mortimer, A. D., & Hastings, T. G. (2013). Dopamine quinone modifies and decreases the abundance of the mitochondrial selenoprotein glutathione peroxidase 4. *Free radical biology & medicine*, 65, 419–427.
- [252] Deas, E., Cremades, N., Angelova, P. R., Ludtmann, M. H., Yao, Z., Chen, S., Horrocks, M. H., Banushi, B., Little, D., Devine, M. J., Gissen, P., Klenerman, D., Dobson, C. M., Wood, N. W., Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2016). Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson's Disease. *Antioxidants & redox signaling*, 24(7), 376–391.

- [253] Cong, W. N., Cai, H., Wang, R., Daimon, C. M., Maudsley, S., Raber, K., Canneva, F., von Hörsten, S., & Martin, B. (2012). Altered hypothalamic protein expression in a rat model of Huntington's disease. *PloS one*, 7(10), e47240.
- [254] Wright, J. A., Richards, T., & Srai, S. K. (2014). The role of iron in the skin and cutaneous wound healing. *Frontiers in pharmacology*, 5, 156.
- [255] Mortensen, M. S., Ruiz, J., & Watts, J. L. (2023). Polyunsaturated Fatty Acids Drive Lipid Peroxidation during Ferroptosis. *Cells*, 12(5), 804.
- [256] Yu, Y., Yan, Y., Niu, F., Wang, Y., Chen, X., Su, G., Liu, Y., Zhao, X., Qian, L., Liu, P., & Xiong, Y. (2021). Ferroptosis: a cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases. *Cell death discovery*, 7(1), 193.
- [257] Laughlin, S. B., de Ruyter van Steveninck, R. R., & Anderson, J. C. (1998). The metabolic cost of neural information. *Nature neuroscience*, 1(1), 36–41.
- [258] Goyal, M. S., & Raichle, M. E. (2018). Glucose Requirements of the Developing Human Brain. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 66 Suppl 3(Suppl 3), S46–S49.
- [259] Cacciatore, M., Grasso, E. A., Tripodi, R., & Chiarelli, F. (2022). Impact of glucose metabolism on the developing brain. *Frontiers in endocrinology*, 13, 1047545.
- [260] Trotta, N., Archambaud, F., Goldman, S., Baete, K., Van Laere, K., Wens, V., Van Bogaert, P., Chiron, C., & De Tiège, X. (2016). Functional integration changes in regional brain glucose metabolism from childhood to adulthood. *Human brain mapping*, 37(8), 3017–3030.
- [261] van Hall, G., Strømstad, M., Rasmussen, P., Jans, O., Zaar, M., Gam, C., Quistorff, B., Secher, N. H., & Nielsen, H. B. (2009). Blood lactate is an important energy source for the human brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(6), 1121–1129.
- [262] Bouzier-Sore, A. K., Voisin, P., Canioni, P., Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (2003). Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(11), 1298–1306.
- [263] Lutas, A., & Yellen, G. (2013). The ketogenic diet: metabolic influences on brain excitability and epilepsy. *Trends in neurosciences*, 36(1), 32–40.

- [264] Divakaruni, A. S., Wallace, M., Buren, C., Martyniuk, K., Andreyev, A. Y., Li, E., Fields, J. A., Cordes, T., Reynolds, I. J., Bloodgood, B. L., Raymond, L. A., Metallo, C. M., & Murphy, A. N. (2017). Inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier protects from excitotoxic neuronal death. *The Journal of cell biology*, 216(4), 1091–1105.
- [265] Dyńka, D., Kowalcze, K., & Paziewska, A. (2022). The Role of Ketogenic Diet in the Treatment of Neurological Diseases. *Nutrients*, 14(23), 5003.
- [266] Koh, S., Dupuis, N., & Auvin, S. (2020). Ketogenic diet and Neuroinflammation. *Epilepsy research*, 167, 106454.
- [267] Campos-Bedolla, P., Walter, F. R., Veszeka, S., & Deli, M. A. (2014). Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Archives of medical research*, 45(8), 610–638.
- [268] Koepsell H. (2020). Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 472(9), 1299–1343.
- [269] Joost, H. G., & Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Molecular membrane biology*, 18(4), 247–256.
- [270] Simpson, I. A., Carruthers, A., & Vannucci, S. J. (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(11), 1766–1791.
- [271] Vannucci, S. J., Clark, R. R., Koehler-Stec, E., Li, K., Smith, C. B., Davies, P., Maher, F., & Simpson, I. A. (1998). Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. *Developmental neuroscience*, 20(4-5), 369–379.
- [272] Szablewski L. (2017). Distribution of glucose transporters in renal diseases. *Journal of biomedical science*, 24(1), 64.
- [273] Simpson, H. B., Foa, E. B., Liebowitz, M. R., Ledley, D. R., Huppert, J. D., Cahill, S., Vermes, D., Schmidt, A. B., Hembree, E., Franklin, M., Campeas, R., Hahn, C. G., & Petkova, E. (2008). A randomized, controlled trial of cognitive-behavioral therapy for augmenting pharmacotherapy in obsessive-compulsive disorder. *The American journal of psychiatry*, 165(5), 621–630.

- [274] Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in neurosciences*, 36(10), 587–597.
- [275] Wamelink, M. M., Struys, E. A., & Jakobs, C. (2008). The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *Journal of inherited metabolic disease*, 31(6), 703–717.
- [276] Zuo, J., Tang, J., Lu, M., Zhou, Z., Li, Y., Tian, H., Liu, E., Gao, B., Liu, T., & Shao, P. (2021). Glycolysis Rate-Limiting Enzymes: Novel Potential Regulators of Rheumatoid Arthritis Pathogenesis. *Frontiers in immunology*, 12, 779787.
- [277] Porporato, P. E., Dhup, S., Dadhich, R. K., Copetti, T., & Sonveaux, P. (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Frontiers in pharmacology*, 2, 49.
- [278] Allaman, I., Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2015). Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Frontiers in neuroscience*, 9, 23.
- [279] Bélanger, M., Yang, J., Petit, J. M., Laroche, T., Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2011). Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(50), 18338–18352.
- [280] Stanton R. C. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB life*, 64(5), 362–369.
- [281] Tang B. L. (2019). Neuroprotection by glucose-6-phosphate dehydrogenase and the pentose phosphate pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 120(9), 14285–14295.
- [282] Lunt, S. Y., & Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 441–464.
- [283] Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N. M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., & Ralser, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 90(3), 927–963.

- [284] Hassan, W., Noreen, H., Rehman, S., Kamal, M. A., & da Rocha, J. B. T. (2022). Association of Oxidative Stress with Neurological Disorders. *Current neuropharmacology*, 20(6), 1046–1072.
- [285] Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., & Bolaños, J. P. (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), 747–752.
- [286] Chiaradonna, F., Ricciardiello, F., & Palorini, R. (2018). The Nutrient-Sensing Hexosamine Biosynthetic Pathway as the Hub of Cancer Metabolic Rewiring. *Cells*, 7(6), 53.
- [287] Wellen, K. E., Lu, C., Mancuso, A., Lemons, J. M., Ryczko, M., Dennis, J. W., Rabinowitz, J. D., Collier, H. A., & Thompson, C. B. (2010). The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes & development*, 24(24), 2784–2799.
- [288] Oe, Y., Baba, O., Ashida, H., Nakamura, K. C., & Hirase, H. (2016). Glycogen distribution in the microwave-fixed mouse brain reveals heterogeneous astrocytic patterns. *Glia*, 64(9), 1532–1545.
- [289] Waitt, A. E., Reed, L., Ransom, B. R., & Brown, A. M. (2017). Emerging Roles for Glycogen in the CNS. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 73.
- [290] Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, L., Vallès, J., García-Fojeda, B., Criado-García, O., Fernández-Sánchez, E., Medraño-Fernández, I., Domínguez, J., García-Rocha, M., Soriano, E., Rodríguez de Córdoba, S., & Guinovart, J. J. (2007). Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nature neuroscience*, 10(11), 1407–1413.
- [291] Patel, M. S., Nemeria, N. S., Furey, W., & Jordan, F. (2014). The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *The Journal of biological chemistry*, 289(24), 16615–16623.
- [292] Stacpoole P. W. (2017). Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(11), 10.1093/jnci/djx071.

- [293] Ryan, D. G., Murphy, M. P., Frezza, C., Prag, H. A., Chouchani, E. T., O'Neill, L. A., & Mills, E. L. (2019). Coupling Krebs cycle metabolites to signalling in immunity and cancer. *Nature metabolism*, 1, 16–33.
- [294] Judge, A., & Dodd, M. S. (2020). Metabolism. *Essays in biochemistry*, 64(4), 607–647.
- [295] DeBerardinis, R. J., & Cheng, T. (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*, 29(3), 313–324.
- [296] Yoo, H. C., Yu, Y. C., Sung, Y., & Han, J. M. (2020). Glutamine reliance in cell metabolism. *Experimental & molecular medicine*, 52(9), 1496–1516.
- [297] Vijay, N., & Morris, M. E. (2014). Role of monocarboxylate transporters in drug delivery to the brain. *Current pharmaceutical design*, 20(10), 1487–1498.
- [298] Pierre, K., & Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *Journal of neurochemistry*, 94(1), 1–14.
- [299] Halestrap, A. P., & Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 447(5), 619–628.
- [300] Coady, M. J., Chang, M. H., Charron, F. M., Plata, C., Wallendorff, B., Sah, J. F., Markowitz, S. D., Romero, M. F., & Lapointe, J. Y. (2004). The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺-monocarboxylate cotransporter. *The Journal of physiology*, 557(Pt 3), 719–731.
- [301] Halestrap, A. P., & Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *The Biochemical journal*, 343 Pt 2(Pt 2), 281–299.
- [302] Valvona, C. J., Fillmore, H. L., Nunn, P. B., & Pilkington, G. J. (2016). The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 26(1), 3–17.
- [303] Erecinska, M., Cherian, S., & Silver, I. A. (2004). Energy metabolism in mammalian brain during development. *Progress in neurobiology*, 73(6), 397–445.
- [304] Bröer, S., Rahman, B., Pellegrini, G., Pellerin, L., Martin, J. L., Verleysdonk, S., Hamprecht, B., & Magistretti, P. J. (1997). Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) expressing *Xenopus*

laevis oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons. *The Journal of biological chemistry*, 272(48), 30096–30102.

- [305] Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(22), 10625–10629.
- [306] Jha, M. K., & Morrison, B. M. (2020). Lactate Transporters Mediate Glia-Neuron Metabolic Crosstalk in Homeostasis and Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 589582.
- [307] Li, X., Yang, Y., Zhang, B., Lin, X., Fu, X., An, Y., Zou, Y., Wang, J. X., Wang, Z., & Yu, T. (2022). Lactate metabolism in human health and disease. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 305.
- [308] Kopperschläger, G., & Kirchberger, J. (1996). Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*, 684(1-2), 25–49
- [309] Read, J. A., Winter, V. J., Eszes, C. M., Sessions, R. B., & Brady, R. L. (2001). Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins*, 43(2), 175–185.
- [310] Zhang, D., Tang, Z., Huang, H., Zhou, G., Cui, C., Weng, Y., Liu, W., Kim, S., Lee, S., Perez-Neut, M., Ding, J., Czyz, D., Hu, R., Ye, Z., He, M., Zheng, Y. G., Shuman, H. A., Dai, L., Ren, B., Roeder, R. G., ... Zhao, Y. (2019). Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature*, 574(7779), 575–580.
- [311] Gao, M., Zhang, N., & Liang, W. (2020). Systematic Analysis of Lysine Lactylation in the Plant Fungal Pathogen *Botrytis cinerea*. *Frontiers in microbiology*, 11, 594743.
- [312] Zhang, N., Jiang, N., Yu, L., Guan, T., Sang, X., Feng, Y., Chen, R., & Chen, Q. (2021). Protein Lactylation Critically Regulates Energy Metabolism in the Protozoan Parasite *Trypanosoma brucei*. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 719720.
- [313] Hagihara, H., Shoji, H., Otabi, H., Toyoda, A., Katoh, K., Namihira, M., & Miyakawa, T. (2021). Protein lactylation induced by neural excitation. *Cell reports*, 37(2), 109820.

- [314] Meng, X., Baine, J. M., Yan, T., & Wang, S. (2021). Comprehensive Analysis of Lysine Lactylation in Rice (*Oryza sativa*) Grains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69(29), 8287–8297.
- [315] Yang, K., Fan, M., Wang, X., Xu, J., Wang, Y., Tu, F., Gill, P. S., Ha, T., Liu, L., Williams, D. L., & Li, C. (2022). Lactate promotes macrophage HMGB1 lactylation, acetylation, and exosomal release in polymicrobial sepsis. *Cell death and differentiation*, 29(1), 133–146.
- [316] Xiong, J., He, J., Zhu, J., Pan, J., Liao, W., Ye, H., Wang, H., Song, Y., Du, Y., Cui, B., Xue, M., Zheng, W., Kong, X., Jiang, K., Ding, K., Lai, L., & Wang, Q. (2022). Lactylation-driven METTL3-mediated RNA m⁶A modification promotes immunosuppression of tumor-infiltrating myeloid cells. *Molecular cell*, 82(9), 1660–1677.e10.
- [317] Gaffney, D. O., Jennings, E. Q., Anderson, C. C., Marentette, J. O., Shi, T., Schou Oxvig, A. M., Streeter, M. D., Johannsen, M., Spiegel, D. A., Chapman, E., Roede, J. R., & Galligan, J. J. (2020). Non-enzymatic Lysine Lactoylation of Glycolytic Enzymes. *Cell chemical biology*, 27(2), 206–213.e6.
- [318] Xie, Y., Hu, H., Liu, M., Zhou, T., Cheng, X., Huang, W., & Cao, L. (2022). The role and mechanism of histone lactylation in health and diseases. *Frontiers in genetics*, 13, 949252.
- [319] Moreno-Yruela, C., Zhang, D., Wei, W., Bæk, M., Liu, W., Gao, J., Danková, D., Nielsen, A. L., Bolding, J. E., Yang, L., Jameson, S. T., Wong, J., Olsen, C. A., & Zhao, Y. (2022). Class I histone deacetylases (HDAC1-3) are histone lysine delactylases. *Science advances*, 8(3), eabi6696.
- [320] Liu, X., Zhang, Y., Li, W., & Zhou, X. (2022). Lactylation, an emerging hallmark of metabolic reprogramming: Current progress and open challenges. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 972020.
- [321] Schurr, A., West, C. A., & Rigor, B. M. (1988). Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4857), 1326–1328.
- [322] Li, X., Yang, N., Wu, Y., Wang, X., Sun, J., Liu, L., Zhang, F., Gong, Y., Zhang, Y., Li, X., Du, D., & Ding, B. (2022). Hypoxia regulates fibrosis-related genes via histone

- lactylation in the placentas of patients with preeclampsia. *Journal of hypertension*, 40(6), 1189–1198.
- [323] Qu, H., Liu, J., Zhang, D., Xie, R., Wang, L., & Hong, J. (2023). Glycolysis in Chronic Liver Diseases: Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities. *Cells*, 12(15), 1930.
- [324] Castillo, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E., & Hashimotodani, Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, 76(1), 70–81.
- [325] Zettl, U. K., Rommer, P., Hipp, P., & Patejdl, R. (2016). Evidence for the efficacy and effectiveness of THC-CBD oromucosal spray in symptom management of patients with spasticity due to multiple sclerosis. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 9(1), 9–30.
- [326] Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., & De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in neurosciences*, 21(12), 521–528.
- [327] Mechoulam, R., Spatz, M., & Shohami, E. (2002). Endocannabinoids and neuroprotection. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2002(129), re5.
- [328] Mechoulam, R., Hanus, L., & Martin, B. R. (1994). Search for endogenous ligands of the cannabinoid receptor. *Biochemical pharmacology*, 48(8), 1537–1544.
- [329] Pertwee R. G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 74(2), 129–180.
- [330] Childers, S. R., & Breivogel, C. S. (1998). Cannabis and endogenous cannabinoid systems. *Drug and alcohol dependence*, 51(1-2), 173–187.
- [331] Di Marzo, V., Bifulco, M., & De Petrocellis, L. (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(9), 771–784.
- [332] Pisanti, S., Malfitano, A. M., Ciaglia, E., Lamberti, A., Ranieri, R., Cuomo, G., Abate, M., Faggiana, G., Proto, M. C., Fiore, D., Laezza, C., & Bifulco, M. (2017). Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacology & therapeutics*, 175, 133–150.
- [333] Linge, R., Jiménez-Sánchez, L., Campa, L., Pilar-Cuéllar, F., Vidal, R., Pazos, A., Adell, A., & Díaz, Á. (2016). Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects

and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology*, 103, 16–26.

- [334] Mecha, M., Feliú, A., Iñigo, P. M., Mestre, L., Carrillo-Salinas, F. J., & Guaza, C. (2013). Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A_{2A} receptors. *Neurobiology of disease*, 59, 141–150.
- [335] Chiavon, A. P., Soares, L. M., Bonato, J. M., Milani, H., Guimarães, F. S., & Weffort de Oliveira, R. M. (2014). Protective effects of cannabidiol against hippocampal cell death and cognitive impairment induced by bilateral common carotid artery occlusion in mice. *Neurotoxicity research*, 26(4), 307–316.
- [336] Pelz, M. C., Schoolcraft, K. D., Larson, C., Spring, M. G., & López, H. H. (2017). Assessing the role of serotonergic receptors in cannabidiol's anticonvulsant efficacy. *Epilepsy & behavior : E&B*, 73, 111–118.
- [337] Klein, T. W., Newton, C., Larsen, K., Lu, L., Perkins, I., Nong, L., & Friedman, H. (2003). The cannabinoid system and immune modulation. *Journal of leukocyte biology*, 74(4), 486–496.
- [338] Hampson, A. J., Grimaldi, M., Lolic, M., Wink, D., Rosenthal, R., & Axelrod, J. (2000). Neuroprotective antioxidants from marijuana. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 274–282.
- [339] Thomas, A., Baillie, G. L., Phillips, A. M., Razdan, R. K., Ross, R. A., & Pertwee, R. G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB₁ and CB₂ receptor agonists in vitro. *British journal of pharmacology*, 150(5), 613–623.
- [340] Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., Moriello, A. S., Davis, J. B., Mechoulam, R., & Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR₁ receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British journal of pharmacology*, 134(4), 845–852.
- [341] Russo, E. B., Burnett, A., Hall, B., & Parker, K. K. (2005). Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochemical research*, 30(8), 1037–1043.
- [342] Sagredo, O., Ramos, J. A., Decio, A., Mechoulam, R., & Fernández-Ruiz, J. (2007). Cannabidiol reduced the striatal atrophy caused 3-nitropropionic acid in vivo by

- mechanisms independent of the activation of cannabinoid, vanilloid TRPV1 and adenosine A2A receptors. *The European journal of neuroscience*, 26(4), 843–851.
- [343] Seeman P. (2016). Cannabidiol is a partial agonist at dopamine D2High receptors, predicting its antipsychotic clinical dose. *Translational psychiatry*, 6(10), e920.
- [344] Chang, R. C., Thangavelu, C. S., Joloya, E. M., Kuo, A., Li, Z., & Blumberg, B. (2022). Cannabidiol promotes adipogenesis of human and mouse mesenchymal stem cells via PPAR γ by inducing lipogenesis but not lipolysis. *Biochemical pharmacology*, 197, 114910.
- [345] Sun, S., Hu, F., Wu, J., & Zhang, S. (2017). Cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose metabolism via pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons. *Redox biology*, 11, 577–585.
- [346] Viudez-Martínez, A., García-Gutiérrez, M. S., Navarrón, C. M., Morales-Calero, M. I., Navarrete, F., Torres-Suárez, A. I., & Manzanares, J. (2018). Cannabidiol reduces ethanol consumption, motivation and relapse in mice. *Addiction biology*, 23(1), 154–164.
- [347] Ghovanloo, M. R., Shuart, N. G., Mezeyova, J., Dean, R. A., Ruben, P. C., & Goodchild, S. J. (2018). Inhibitory effects of cannabidiol on voltage-dependent sodium currents. *The Journal of biological chemistry*, 293(43), 16546–16558.
- [348] Campos, A. C., Fogaça, M. V., Scarante, F. F., Joca, S. R. L., Sales, A. J., Gomes, F. V., Sonego, A. B., Rodrigues, N. S., Galve-Roperh, I., & Guimarães, F. S. (2017). Plastic and Neuroprotective Mechanisms Involved in the Therapeutic Effects of Cannabidiol in Psychiatric Disorders. *Frontiers in pharmacology*, 8, 269.
- [349] Vrechi, T. A. M., Leão, A. H. F. F., Morais, I. B. M., Abílio, V. C., Zuardi, A. W., Hallak, J. E. C., Crippa, J. A., Binoletto, C., Ureshino, R. P., Smaili, S. S., & Pereira, G. J. S. (2021). Cannabidiol induces autophagy via ERK1/2 activation in neural cells. *Scientific reports*, 11(1), 5434.
- [350] Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *BioMed research international*, 2018, 1691428.

- [351] de Almeida, D. L., & Devi, L. A. (2020). Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacology research & perspectives*, 8(6), e00682.
- [352] Tehran, D. A., & Pirazzini, M. (2018). Preparation of Cerebellum Granule Neurons from Mouse or Rat Pups and Evaluation of Clostridial Neurotoxin Activity and Their Inhibitors by Western Blot and Immunohistochemistry. *Bio-protocol*, 8(13), e2918.
- [353] Milner, M. T., Lawrence, G. M., Holley, C. L., Bodea, L. G., Götz, J., Burgener, S. S., & Schroder, K. (2022). Isolation and culture of pure adult mouse microglia and astrocytes for *in vitro* characterization and analyses. *STAR protocols*, 3(2), 101295.
- [354] Beaudoin, G. M., 3rd, Lee, S. H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Y. G., Reichardt, L. F., & Arikath, J. (2012). Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature protocols*, 7(9), 1741–1754.
- [355] Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature neuroscience*, 5(5), 405–414.
- [356] Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, 36(1), 59–74.
- [357] Li P., Qiu N., Zhang L., Zhong G., Zeng F. (2019). A more universal and stable method for lactate dehydrogenase isoenzyme test. *Analytical Methods*, 11 (32), pp. 4173-4183.
- [358] Kaur, G., Singh, H., & Singh, J. (2021). Green sustainable process for chemical and environmental engineering and science. Elsevier, pp. 49-68.
- [359] Szabadkai, G., & Rizzuto, R. (2004). *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier Inc, pp. 405-410.
- [360] Engwa, G. A., EnNwekegw, F. N., & Nkeh-Chungag, B. N. (2022). Free Radicals, Oxidative Stress-Related Diseases and Antioxidant Supplementation. *Alternative therapies in health and medicine*, 28(1), 114–128.
- [361] Davies, AG., Griller, D., Ingold, KU., Lindsay, DA. and Walton, JC. (1981). An electron spin resonance study of pentadienyl and related radicals: homolytic fission of cyclobut-2-enylmethyl radicals. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, II:633-641.
- [362] Desai, S.N., Farris, F.F., Ray, S.D. (2014). Lipid Peroxidation. In: Wexler, P. (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology*. Academic Press, pp. 89–93.

- [363] Senthilkumar, M., & Amaresan, N., Sankaranarayanan, A. (2021). Estimation of Malondialdehyde (MDA) by Thiobarbituric Acid (TBA) Assay. In: Plant-Microbe Interactions. Springer Protocols Handbooks, pp. 103—105.
- [364] Aguilar Diaz De Leon, J., & Borges, C. R. (2020). Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (159), 10.3791/61122.
- [365] Lecerof, D., Fodje, M.N., Alvarez León, R. et al. (2003) Metal binding to *Bacillus subtilis* ferrochelatase and interaction between metal sites. *J Biol Inorg Chem* 8, 452–458.
- [366] Boumezbeur, F., Mason, G. F., de Graaf, R. A., Behar, K. L., Cline, G. W., Shulman, G. I., Rothman, D. L., & Petersen, K. F. (2010). Altered brain mitochondrial metabolism in healthy aging as assessed by in vivo magnetic resonance spectroscopy. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(1), 211–221.
- [367] Mattson, M. P., & Arumugam, T. V. (2018). Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell metabolism*, 27(6), 1176–1199.
- [368] Yang, W., Pang, D., Chen, M., Du, C., Jia, L., Wang, L., He, Y., Jiang, W., Luo, L., Yu, Z., Mao, M., Yuan, Q., Tang, P., Xia, X., Cui, Y., Jing, B., Platero, A., Liu, Y., Wei, Y., Worley, P. F., ... Xiao, B. (2021). Rheb mediates neuronal-activity-induced mitochondrial energetics through mTORC1-independent PDH activation. *Developmental cell*, 56(6), 811–825.e6.
- [369] Cheah, J. H., Kim, S. F., Hester, L. D., Clancy, K. W., Patterson, S. E., 3rd, Papadopoulos, V., & Snyder, S. H. (2006). NMDA receptor-nitric oxide transmission mediates neuronal iron homeostasis via the GTPase Dexas1. *Neuron*, 51(4), 431–440.
- [370] Pelizzoni, I., Macco, R., Morini, M. F., Zacchetti, D., Grohovaz, F., & Codazzi, F. (2011). Iron handling in hippocampal neurons: activity-dependent iron entry and mitochondria-mediated neurotoxicity. *Aging cell*, 10(1), 172–183.
- [371] Gaasch, J. A., Geldenhuys, W. J., Lockman, P. R., Allen, D. D., & Van der Schyf, C. J. (2007). Voltage-gated calcium channels provide an alternate route for iron uptake in neuronal cell cultures. *Neurochemical research*, 32(10), 1686–1693.

- [372] Zhang, S. J., Zou, M., Lu, L., Lau, D., Ditzel, D. A., Delucinge-Vivier, C., Aso, Y., Descombes, P., & Bading, H. (2009). Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS genetics*, 5(8), e1000604.
- [373] Kim, H. J., Khalimonchuk, O., Smith, P. M., & Winge, D. R. (2012). Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(9), 1604–1616.
- [374] Stehling, O., & Lill, R. (2013). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(8), a011312.
- [375] Greer, P. L., & Greenberg, M. E. (2008). From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron*, 59(6), 846–860.
- [376] Bading H. (2013). Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(9), 593–608.
- [377] Lonze, B. E., & Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35(4), 605–623.
- [378] Bastian, T. W., von Hohenberg, W. C., Mickelson, D. J., Lanier, L. M., & Georgieff, M. K. (2016). Iron Deficiency Impairs Developing Hippocampal Neuron Gene Expression, Energy Metabolism, and Dendrite Complexity. *Developmental neuroscience*, 38(4), 264–276.
- [379] Chen, Y. C., Wu, Y. T., & Wei, Y. H. (2015). Depletion of mitoferrins leads to mitochondrial dysfunction and impairment of adipogenic differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *Free radical research*, 49(11), 1285–1295.
- [380] Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(8), 599–609.
- [381] Deisseroth, K., Bito, H., & Tsien, R. W. (1996). Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 16(1), 89–101.
- [382] Ahn, S., Olive, M., Aggarwal, S., Krylov, D., Ginty, D. D., & Vinson, C. (1998). A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of

stimulus-dependent transcription of c-fos. *Molecular and cellular biology*, 18(2), 967–977.

- [383] Tuo, Q. Z., Lei, P., Jackman, K. A., Li, X. L., Xiong, H., Li, X. L., Liuyang, Z. Y., Roisman, L., Zhang, S. T., Ayton, S., Wang, Q., Crouch, P. J., Ganio, K., Wang, X. C., Pei, L., Adlard, P. A., Lu, Y. M., Cappai, R., Wang, J. Z., Liu, R., ... Bush, A. I. (2017). Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke. *Molecular psychiatry*, 22(11), 1520–1530.
- [384] Brown, C. W., Amante, J. J., Chhoy, P., Elaimy, A. L., Liu, H., Zhu, L. J., Baer, C. E., Dixon, S. J., & Mercurio, A. M. (2019). Prominin2 Drives Ferroptosis Resistance by Stimulating Iron Export. *Developmental cell*, 51(5), 575–586.e4.
382 y 383
- [385] Terzi, E. M., Sviderskiy, V. O., Alvarez, S. W., Whiten, G. C., & Possemato, R. (2021). Iron-sulfur cluster deficiency can be sensed by IRP2 and regulates iron homeostasis and sensitivity to ferroptosis independent of IRP1 and FBXL5. *Science advances*, 7(22), eabg4302.
- [386] Kelly, C. J., Couch, R. K., Ha, V. T., Bodart, C. M., Wu, J., Huff, S., Herrel, N. T., Kim, H. D., Zimmermann, A. O., Shattuck, J., Pan, Y. C., Kaeberlein, M., & Grillo, A. S. (2023). Iron status influences mitochondrial disease progression in Complex I-deficient mice. *eLife*, 12, e75825.
- [387] Yang, W. S., & Stockwell, B. R. (2016). Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends in cell biology*, 26(3), 165–176.
- [388] Lei, P., Bai, T., & Sun, Y. (2019). Mechanisms of Ferroptosis and Relations With Regulated Cell Death: A Review. *Frontiers in physiology*, 10, 139.
- [389] Petruzzella, V., Vergari, R., Puzziferri, I., Boffoli, D., Lamantea, E., Zeviani, M., & Papa, S. (2001). A nonsense mutation in the NDUF54 gene encoding the 18 kDa (AQDQ) subunit of complex I abolishes assembly and activity of the complex in a patient with Leigh-like syndrome. *Human molecular genetics*, 10(5), 529–535.
- [390] Scacco, S., Petruzzella, V., Budde, S., Vergari, R., Tamborra, R., Panelli, D., van den Heuvel, L. P., Smeitink, J. A., & Papa, S. (2003). Pathological mutations of the human NDUF54 gene of the 18-kDa (AQDQ) subunit of complex I affect the expression of the protein and the assembly and function of the complex. *The Journal of biological chemistry*, 278(45), 44161–44167.

- [391] Schon, E. A., & Przedborski, S. (2011). Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron*, 70(6), 1033–1053.
- [392] van de Wal, M. A. E., Adjobo-Hermans, M. J. W., Keijer, J., Schirris, T. J. J., Homberg, J. R., Wieckowski, M. R., Grefte, S., van Schothorst, E. M., van Karnebeek, C., Quintana, A., & Koopman, W. J. H. (2022). Ndufs4 knockout mouse models of Leigh syndrome: pathophysiology and intervention. *Brain : a journal of neurology*, 145(1), 45–63.
- [393] Distelmaier, F., Koopman, W. J., van den Heuvel, L. P., Rodenburg, R. J., Mayatepek, E., Willems, P. H., & Smeitink, J. A. (2009). Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain : a journal of neurology*, 132(Pt 4), 833–842.
- [394] Iuso, A., Scacco, S., Piccoli, C., Bellomo, F., Petruzzella, V., Trentadue, R., Minuto, M., Ripoli, M., Capitanio, N., Zeviani, M., & Papa, S. (2006). Dysfunctions of cellular oxidative metabolism in patients with mutations in the NDUFS1 and NDUFS4 genes of complex I. *The Journal of biological chemistry*, 281(15), 10374–10380.
- [395] Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(1), 11–21.
- [396] Duchen M. R. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of physiology*, 529 Pt 1(Pt 1), 57–68.
- [397] Cárdenas, C., Miller, R. A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., Vais, H., Cheung, K. H., Yang, J., Parker, I., Thompson, C. B., Birnbaum, M. J., Hallows, K. R., & Foskett, J. K. (2010). Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell*, 142(2), 270–283.
- [398] Hansford, R. G., & Zorov, D. (1998). Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Molecular and cellular biochemistry*, 184(1-2), 359–369.
- [399] Ryan, D., Drysdale, A. J., Lafourcade, C., Pertwee, R. G., & Platt, B. (2009). Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(7), 2053–2063.
- [400] Serrat, R., Covelo, A., Kouskoff, V., Delcasso, S., Ruiz-Calvo, A., Chenouard, N., Stella, C., Blancard, C., Salin, B., Julio-Kalajzić, F., Cannich, A., Massa, F., Varilh, M.,

- Deforges, S., Robin, L. M., De Stefani, D., Busquets-Garcia, A., Gambino, F., Beyeler, A., Pouvreau, S., ... Marsicano, G. (2021). Astroglial ER-mitochondria calcium transfer mediates endocannabinoid-dependent synaptic integration. *Cell reports*, 37(12), 110133.
- [401] Silver, I. A., & Erecińska, M. (1994). Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 14(8), 5068–5076.
- [402] Dienel G. A. (2019). Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. *Physiological reviews*, 99(1), 949–1045.
- [403] Yang, M., Darwish, T., Larraufie, P., Rimmington, D., Cimino, I., Goldspink, D. A., Jenkins, B., Koulman, A., Brighton, C. A., Ma, M., Lam, B. Y. H., Coll, A. P., O'Rahilly, S., Reimann, F., & Gribble, F. M. (2021). Inhibition of mitochondrial function by metformin increases glucose uptake, glycolysis and GDF-15 release from intestinal cells. *Scientific reports*, 11(1), 2529.
- [404] Denko N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature reviews. Cancer*, 8(9), 705–713.
- [405] Semenza G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399–408.
- [406] Firth, J. D., Ebert, B. L., & Ratcliffe, P. J. (1995). Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *The Journal of biological chemistry*, 270(36), 21021–21027.
- [407] Ullah, M. S., Davies, A. J., & Halestrap, A. P. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 281(14), 9030–9037.
- [408] Zhang, W., Guo, C., Jiang, K., Ying, M., & Hu, X. (2017). Quantification of lactate from various metabolic pathways and quantification issues of lactate isotopologues and isotopmers. *Scientific reports*, 7(1), 8489.
- [409] TeSlaa, T., & Teitell, M. A. (2014). Techniques to monitor glycolysis. *Methods in enzymology*, 542, 91–114.

- [410] Adeva-Andany, M., López-Ojén, M., Funcasta-Calderón, R., Ameneiros-Rodríguez, E., Donapetry-García, C., Vila-Altesor, M., & Rodríguez-Seijas, J. (2014). Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion*, 17, 76–100.
- [411] Bauhammer, I., Sacha, M., & Haltner, E. (2019). Validation and stability analysis of a modified lactate dehydrogenase (LDH) test method to be employed for an in vitro viable skin model. *Heliyon*, 5(5), e01618.
- [412] Di Cello, A., Borelli, M., Marra, M. L., Franzon, M., D'Alessandro, P., Di Carlo, C., Venturella, R., & Zullo, F. (2019). A more accurate method to interpret lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes' results in patients with uterine masses. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 236, 143–147.
- [413] Nian, F., Qian, Y., Xu, F., Yang, M., Wang, H., & Zhang, Z. (2022). LDHA promotes osteoblast differentiation through histone lactylation. *Biochemical and biophysical research communications*, 615, 31–35.
- [414] Carnero, A., & Paramio, J. M. (2014). The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, Cancer Mouse Models. *Frontiers in oncology*, 4, 252.
- [415] Coloff, J. L., Macintyre, A. N., Nichols, A. G., Liu, T., Gallo, C. A., Plas, D. R., & Rathmell, J. C. (2011). Akt-dependent glucose metabolism promotes Mcl-1 synthesis to maintain cell survival and resistance to Bcl-2 inhibition. *Cancer research*, 71(15), 5204–5213.
- [416] Ni, Y., Zhou, Y., Zhou, M., & Zhang, L. (2015). Akt and cAMP response element binding protein mediate 17 β -estradiol regulation of glucose transporter 3 expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Neuroscience letters*, 604, 58–63.
- [417] Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., Zhuang, H., Cinalli, R. M., Alavi, A., Rudin, C. M., & Thompson, C. B. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer research*, 64(11), 3892–3899.
- [418] Barnes, E. M. E., Xu, Y., Benito, A., Herendi, L., Siskos, A. P., Aboagye, E. O., Nijhuis, A., & Keun, H. C. (2020). Lactic acidosis induces resistance to the pan-Akt inhibitor uprosertib in colon cancer cells. *British journal of cancer*, 122(9), 1298–1308.

- [419] Hudson, R., Rushlow, W., & Laviolette, S. R. (2018). Phytocannabinoids modulate emotional memory processing through interactions with the ventral hippocampus and mesolimbic dopamine system: implications for neuropsychiatric pathology. *Psychopharmacology*, 235(2), 447–458.
- [420] Urasaki, Y., Beaumont, C., Workman, M., Talbot, J. N., Hill, D. K., & Le, T. T. (2020). Potency Assessment of CBD Oils by Their Effects on Cell Signaling Pathways. *Nutrients*, 12(2), 357.
- [421] Pan, R. Y., He, L., Zhang, J., Liu, X., Liao, Y., Gao, J., Liao, Y., Yan, Y., Li, Q., Zhou, X., Cheng, J., Xing, Q., Guan, F., Zhang, J., Sun, L., & Yuan, Z. (2022). Positive feedback regulation of microglial glucose metabolism by histone H4 lysine 12 lactylation in Alzheimer's disease. *Cell metabolism*, 34(4), 634–648.e6.
- [422] Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G. I., Latina, V., De Filippis, D., Cipriano, M., Carratù, M. R., Iuvone, T., & Steardo, L. (2011). Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PloS one*, 6(12), e28668.
- [423] Ghanta, S., Grossmann, R. E., and Brenner, C. (2013). Mitochondrial protein acetylation as a cell-intrinsic, evolutionary driver of fat storage: chemical and metabolic logic of acetyl-lysine modifications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48, 561–574.
- [424] Gella, A., Prada-Dacasa, P., Carrascal, M., Urpi, A., González-Torres, M., Abian, J., Sanz, E., & Quintana, A. (2020). Mitochondrial Proteome of Affected Glutamatergic Neurons in a Mouse Model of Leigh Syndrome. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 660.
- [425] Zhang, Y., Wen, P., Luo, J., Ding, H., Cao, H., He, W., Zen, K., Zhou, Y., Yang, J., & Jiang, L. (2021). Sirtuin 3 regulates mitochondrial protein acetylation and metabolism in tubular epithelial cells during renal fibrosis. *Cell death & disease*, 12(9), 847.
- [426] Nicoll R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 281–290.
- [427] Chang, X., Wu, Y., Zhou, J., Meng, H., Zhang, W., & Guo, J. (2020). A meta-analysis and systematic review of Leigh syndrome: clinical manifestations, respiratory chain enzyme complex deficiency, and gene mutations. *Medicine*, 99(5), e18634.

- [428] Stenton, S. L., & Prokisch, H. (2020). Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine*, 56, 102784.
- [429] Liang, T., Qian, Z. M., Mu, M. D., Yung, W. H., & Ke, Y. (2020). Brain Hepcidin Suppresses Major Pathologies in Experimental Parkinsonism. *iScience*, 23(7), 101284.
- [430] Lu, Y., Yang, Q., Su, Y., Ji, Y., Li, G., Yang, X., Xu, L., Lu, Z., Dong, J., Wu, Y., Bei, J. X., Pan, C., Gu, X., & Li, B. (2021). MYCN mediates TFRC-dependent ferroptosis and reveals vulnerabilities in neuroblastoma. *Cell death & disease*, 12(6), 511.
- [431] Anderson, C. P., Shen, M., Eisenstein, R. S., & Leibold, E. A. (2012). Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(9), 1468–1483.
- [432] Chen, X. J., Wang, X., Kaufman, B. A., & Butow, R. A. (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5710), 714–717.
- [433] Chen, X. J., Wang, X., & Butow, R. A. (2007). Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), 13738–13743.
- [434] Zhu, T., Xiao, Z., Yuan, H., Tian, H., Chen, T., Chen, Q., Chen, M., Yang, J., Zhou, Q., Guo, W., Xue, K., Xia, M., Bao, J., Yang, C., Duan, H., Wang, H., Huang, Z., Liu, C., & Zhou, J. (2022). ACO1 and IREB2 downregulation confer poor prognosis and correlate with autophagy-related ferroptosis and immune infiltration in KIRC. *Frontiers in oncology*, 12, 929838.
- [435] Zumbrennen-Bullough, K. B., Becker, L., Garrett, L., Hölter, S. M., Calzada-Wack, J., Mossbrugger, I., Quintanilla-Fend, L., Racz, I., Rathkolb, B., Klopstock, T., Wurst, W., Zimmer, A., Wolf, E., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., de Angelis, M. H., Romney, S. J., & Leibold, E. A. (2014). Abnormal brain iron metabolism in *Irp2* deficient mice is associated with mild neurological and behavioral impairments. *PloS one*, 9(6), e98072.
- [436] Bao, W. D., Pang, P., Zhou, X. T., Hu, F., Xiong, W., Chen, K., Wang, J., Wang, F., Xie, D., Hu, Y. Z., Han, Z. T., Zhang, H. H., Wang, W. X., Nelson, P. T., Chen, J. G., Lu, Y., Man, H. Y., Liu, D., & Zhu, L. Q. (2021). Loss of ferroportin induces memory

impairment by promoting ferroptosis in Alzheimer's disease. *Cell death and differentiation*, 28(5), 1548–1562.

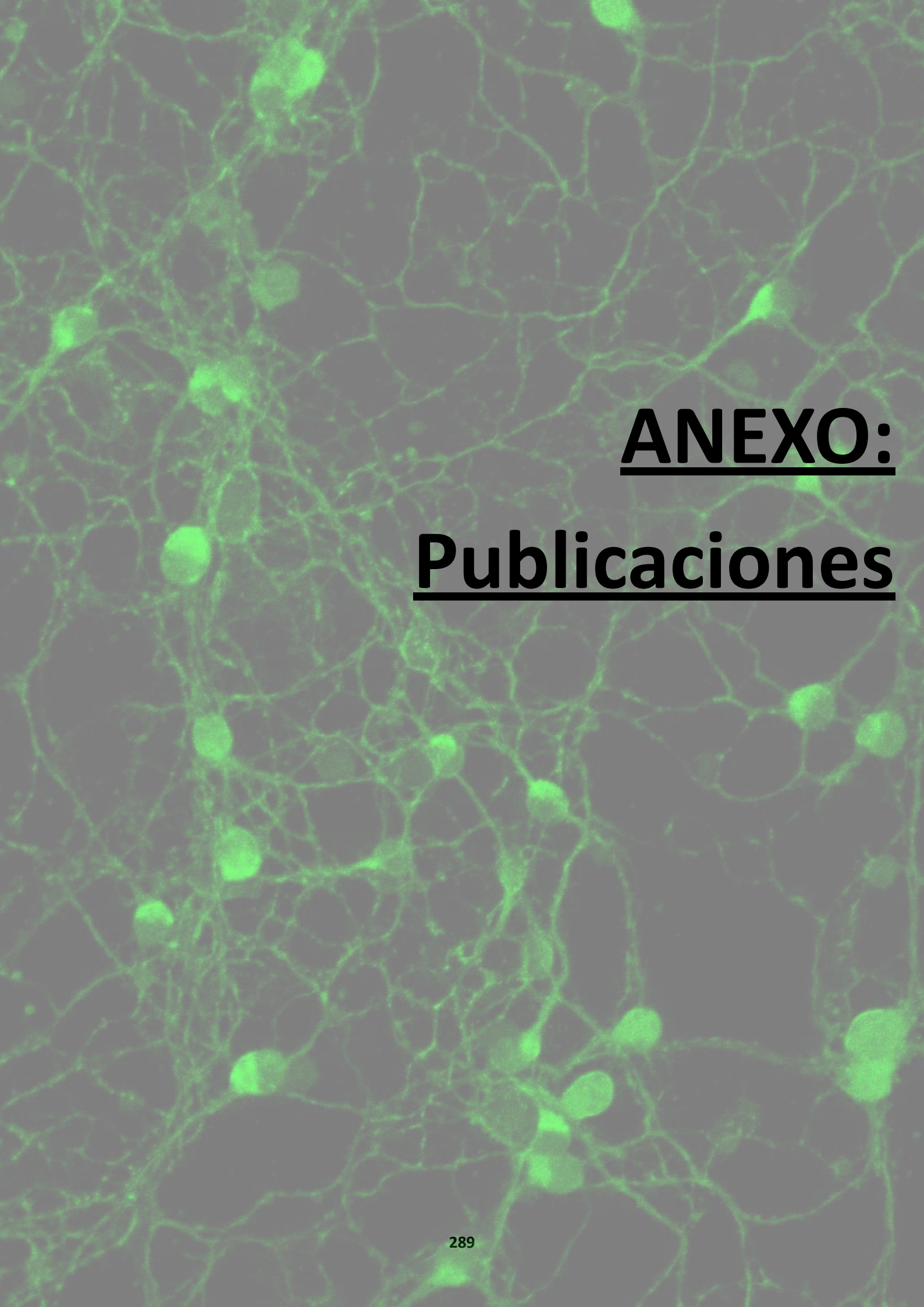
- [437] Díaz-García, C. M., Mongeon, R., Lahmann, C., Koveal, D., Zucker, H., & Yellen, G. (2017). Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake. *Cell metabolism*, 26(2), 361–374.e4.
- [438] Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., & Devin, A. (2011). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et biophysica acta*, 1807(6), 568–576.
- [439] Warburg, O. (1925). The Metabolism of Carcinoma Cells. *J. Cancer Res.* 1925;9:148–163.
- [440] Wijburg, F. A., Barth, P. G., Bindoff, L. A., Birch-Machin, M. A., van der Blij, J. F., Ruitenbeek, W., Turnbull, D. M., & Schutgens, R. B. (1992). Leigh syndrome associated with a deficiency of the pyruvate dehydrogenase complex: results of treatment with a ketogenic diet. *Neuropediatrics*, 23(3), 147–152.
- [441] Johnson, S. C., Yanos, M. E., Kayser, E. B., Quintana, A., Sangesland, M., Castanza, A., Uhde, L., Hui, J., Wall, V. Z., Gagnidze, A., Oh, K., Wasko, B. M., Ramos, F. J., Palmiter, R. D., Rabinovitch, P. S., Morgan, P. G., Sedensky, M. M., & Kaeberlein, M. (2013). mTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6165), 1524–1528.
- [442] Nichols, J. M., & Kaplan, B. L. F. (2020). Immune Responses Regulated by Cannabidiol. *Cannabis and cannabinoid research*, 5(1), 12–31.
- [443] Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., & Hanus, L. O. (2007). Cannabidiol--recent advances. *Chemistry & biodiversity*, 4(8), 1678–1692.
- [444] Ryan, D., Drysdale, A. J., Lafourcade, C., Pertwee, R. G., & Platt, B. (2009). Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(7), 2053–2063.
- [445] Bhunia, S., Kolishetti, N., Arias, A. Y., Vashist, A., & Nair, M. (2022). Cannabidiol for neurodegenerative disorders: A comprehensive review. *Frontiers in pharmacology*, 13, 989717.

- [446] Silvinato, A., Floriano, I. & Bernardo, W. M. Use of cannabidiol in the treatment of epilepsy: Lennox-Gastaut syndrome, Dravet syndrome, and tuberous sclerosis complex. *Rev. Assoc. Medica Bras.* 1992 68, 1345–1357 (2022).
- [447] Castillo, A., Tolón, M. R., Fernández-Ruiz, J., Romero, J., & Martinez-Orgado, J. (2010). The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiology of disease*, 37(2), 434–440.
- [448] Jimenez-Blasco, D., Busquets-Garcia, A., Hebert-Chatelain, E., Serrat, R., Vicente-Gutierrez, C., Ioannidou, C., Gómez-Sotres, P., Lopez-Fabuel, I., Resch-Beusher, M., Resel, E., Arnouil, D., Saraswat, D., Varilh, M., Cannich, A., Julio-Kalajzic, F., Bonilla-Del Río, I., Almeida, A., Puente, N., Achicallende, S., Lopez-Rodriguez, M. L., ... Marsicano, G. (2020). Glucose metabolism links astroglial mitochondria to cannabinoid effects. *Nature*, 583(7817), 603–608.
- [449] Kandel, E. S., & Hay, N. (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Experimental cell research*, 253(1), 210–229.
- [450] Papa, S., Choy, P. M., & Bubici, C. (2019). The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming. *Oncogene*, 38(13), 2223–2240.
- [451] Yu, J. S., & Cui, W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development (Cambridge, England)*, 143(17), 3050–3060.
- [452] Song, G., Ouyang, G., & Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine*, 9(1), 59–71.
- [453] Zhao, Y., Hu, X., Liu, Y., Dong, S., Wen, Z., He, W., Zhang, S., Huang, Q., & Shi, M. (2017). ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Molecular cancer*, 16(1), 79.
- [454] Davis, M. I., Ronesi, J., & Lovinger, D. M. (2003). A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(49), 48973–48980.
- [455] Sun, S., Hu, F., Wu, J., & Zhang, S. (2017). Cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose

metabolism via pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons. *Redox biology*, 11, 577–585.

- [456] Costa, A. M., Russo, F., Senn, L., Ibatici, D., Cannazza, G., & Biagini, G. (2022). Antiseizure Effects of Cannabidiol Leading to Increased Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Levels in the Hippocampal CA3 Subfield of Epileptic Rats. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(5), 495.
- [457] Jurkowski, W., Roomp, K., Crespo, I., Schneider, J. G., & Del Sol, A. (2011). PPAR γ population shift produces disease-related changes in molecular networks associated with metabolic syndrome. *Cell death & disease*, 2(8), e192.
- [458] Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature medicine*, 19(5), 557–566.
- [459] Umemoto, T., & Fujiki, Y. (2012). Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR α and PPAR γ . *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 17(7), 576–596.
- [460] Picard, F., & Auwerx, J. (2002). PPAR(gamma) and glucose homeostasis. *Annual review of nutrition*, 22, 167–197.
- [461] Dello Russo, C., Gavriluk, V., Weinberg, G., Almeida, A., Bolanos, J. P., Palmer, J., Pelligrino, D., Galea, E., & Feinstein, D. L. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma thiazolidinedione agonists increase glucose metabolism in astrocytes. *The Journal of biological chemistry*, 278(8), 5828–5836.
- [462] Badeau, R. M., Honka, M. J., Lautamäki, R., Stewart, M., Kangas, A. J., Soininen, P., Ala-Korpela, M., & Nuutila, P. (2014). Systemic metabolic markers and myocardial glucose uptake in type 2 diabetic and coronary artery disease patients treated for 16 weeks with rosiglitazone, a PPAR γ agonist. *Annals of medicine*, 46(1), 18–23.
- [463] Gorga, A., Rindone, G. M., Regueira, M., Pellizzari, E. H., Camberos, M. C., Cigorraga, S. B., Riera, M. F., Galardo, M. N., & Meroni, S. B. (2017). PPAR γ activation regulates lipid droplet formation and lactate production in rat Sertoli cells. *Cell and tissue research*, 369(3), 611–624.
- [464] Hoffmann, B. R., El-Mansy, M. F., Sem, D. S., & Greene, A. S. (2012). Chemical proteomics-based analysis of off-target binding profiles for rosiglitazone and

pioglitazone: clues for assessing potential for cardiotoxicity. *Journal of medicinal chemistry*, 55(19), 8260–8271.

The background of the page is a grayscale microscopic image of neural tissue. It shows a dense network of fine, branching lines representing axons or dendrites. Scattered throughout this network are numerous bright green, oval-shaped spots, which likely represent fluorescently labeled cells or specific components of the tissue.

ANEXO:

Publicaciones

Como resultado directo de esta tesis doctoral se ha publicado el siguiente artículo:

- Tena-Morraja, P., Riqué-Pujol, G., Müller-Sánchez, C., Reina, M., Martínez-Estrada, O. M., & Soriano, F. X. (2023). Synaptic Activity Regulates Mitochondrial Iron Metabolism to Enhance Neuronal Bioenergetics. *International journal of molecular sciences*, 24(2), 922.

Durante la publicación de esta tesis doctoral se ha colaborado en la publicación de los siguientes

artículos:

- Casellas-Díaz, S., Larramona-Arcas, R., Riqué-Pujol, G., Tena-Morraja, P., Müller-Sánchez, C., Segarra-Mondejar, M., Gavalda-Navarro, A., Villarroya, F., Reina, M., Martínez-Estrada, O. M., & Soriano, F. X. (2021). Mfn2 localization in the ER is necessary for its bioenergetic function and neuritic development. *EMBO reports*, 22(9), e51954.

•Autors: Emma Puighermanal, Marta Luna-Sánchez, Alejandro Gella, Andrea Urpi, Maria Royo, Paula Tena, Isabella Appiah, Maria Helena de Donato, Fabien Menardy, Patrizia Bianchi, Anna Esteve Codina, Laura Rodríguez Pascau, Cristina Vergara, Gunter van der Walt, Mercè GómezPallarès, Marc Martinell, Elisenda Sanz, Sandra Jurado, Francesc Xavier Soriano, Pilar Pizcueta, Albert Quintana.

Títol: ' Cannabidiol ameliorates mitochondrial disease via PPARg activation '. Revista: (In revision, *Nature communications*)



Article

Synaptic Activity Regulates Mitochondrial Iron Metabolism to Enhance Neuronal Bioenergetics

Paula Tena-Morrajá ^{1,2} , Guillem Riqué-Pujol ^{1,2} , Claudia Müller-Sánchez ¹, Manuel Reina ¹, Ofelia M. Martínez-Estrada ^{1,3} and Francesc X. Soriano ^{1,2,*}

¹ Celltec-UB, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain

² Institut de Neurociències (UBNeuro), Universitat de Barcelona (UB), 08035 Barcelona, Spain

³ Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain

* Correspondence: f.x.soriano@ub.edu

Abstract: Synaptic activity is the main energy-consuming process in the central nervous system. We are beginning to understand how energy is supplied and used during synaptic activity by neurons. However, the long-term metabolic adaptations associated with a previous episode of synaptic activity are not well understood. Herein, we show that an episode of synaptic activity increases mitochondrial bioenergetics beyond the duration of the synaptic activity by transcriptionally inducing the expression of iron metabolism genes with the consequent enhancement of cellular and mitochondrial iron uptake. Iron is a necessary component of the electron transport chain complexes, and its chelation or knockdown of mitochondrial iron transporter Mfrn1 blocks the activity-mediated bioenergetics boost. We found that Mfrn1 expression is regulated by the well-known regulator of synaptic plasticity CREB, suggesting the coordinated expression of synaptic plasticity programs with those required to meet the associated increase in energetic demands.

Keywords: iron; mitochondria; bioenergetics; neuron; oxygen consumption; synaptic activity; transcription



Citation: Tena-Morrajá, P.; Riqué-Pujol, G.; Müller-Sánchez, C.; Reina, M.; Martínez-Estrada, O.M.; Soriano, F.X. Synaptic Activity Regulates Mitochondrial Iron Metabolism to Enhance Neuronal Bioenergetics. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 922. <https://doi.org/10.3390/ijms24020922>

Academic Editors: Bernhard Michalke and Vivek Venkataramani

Received: 15 December 2022

Revised: 26 December 2022

Accepted: 28 December 2022

Published: 4 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The brain is the most energy-demanding organ in the body. Accounting for 2% of the body mass, the brain consumes 20% of the oxygen used by the resting body. Around 75% of the energy expenditure in the brain is used in processes related to synaptic transmission, such as reestablishment of ion balance or neurotransmitter recycling [1]. As a consequence of synaptic activity, there are structural and functional adaptations in which synapses are potentiated, resulting in an increase in the strength of these synapses, a form of synaptic plasticity that is involved in learning and memory [2]. This synaptic strengthening also increases energy expenditure and, therefore, requires an increased ATP supply [1]. Most of the ATP generated in the neuron is produced by mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) [1]. Therefore, neurons with persistent synaptic activity must experience long-lasting bioenergetics remodelling to support increased activity-related energetic demand. Understanding the mechanism by which this remodelling takes place has important implications for enhancing neuronal metabolism in conditions, such as aging, in which bioenergetics capabilities decline [3,4].

Iron is an essential metal used in several oxidation/reduction reactions involved among others in DNA biosynthesis and repair, oxygen transfer and energy production [5,6]. Iron is taken up into the cell through receptors and transporters [6]. Intracellular iron is stored by cytosolic ferritin or targeted to mitochondria, which is the major cellular site of iron utilization [7]. Iron enters the mitochondrial matrix through the mitochondrial iron transporters mitoferrins (Mfrn1 and Mfrn2) [8]. Within the mitochondria, iron is used for the

synthesis of heme and iron–sulfur clusters (ISC) proteins or stored in mitochondrial ferritin (FTMT) [7]. Iron in its ferrous state is exported out of the cell via ferroportin (FPN) [9–11].

Iron-containing heme and ISC proteins are essential components of electron transport chain complexes and some enzymes of the tricarboxylic cycle (TCA) [12,13]. During OXPHOS, electrons are transferred from electron donors, mainly produced in the TCA, to mitochondrial complexes within the inner mitochondrial membrane (IMM) that constitute the electron transport chain. The transfer of electrons from one mitochondrial complex to another is coupled with the transfer of protons to the intermembrane space and across the IMM to generate an electrochemical proton gradient that drives the synthesis of ATP. Heme shortage compromises mitochondrial respiration, as heme groups are required for anchorage and activity of respiratory complexes [12]. Therefore, alterations in mitochondrial iron content disturb mitochondrial ATP production [14,15].

Herein, we show that an episode of synaptic activity enhances mitochondrial metabolism by regulating neuronal iron metabolism at the transcriptional level, as shown by the impairment of activity-dependent bioenergetics when neurons are treated with an iron-chelating molecule or by knocking down the expression of the mitochondria iron uptake protein Mfrn1. Mfrn1 is regulated by CREB, and consequently, the expression of dominant negative A-CREB also blocks the activity-mediated bioenergetic boost, suggesting the coordinated expression of plasticity and bioenergetics genes.

2. Results

2.1. Synaptic Activity Enhances Mitochondrial Bioenergetics

Synaptic function accounts for most of the energetic expenditure of neurons [1]. Therefore, we studied whether there are modifications to mitochondrial energetics in neurons that have experienced an episode of synaptic activity. We used an established method of network disinhibition to enhance synaptic activity in cultures of primary cortical neurons by applying the GABAA receptor antagonist bicuculline (Bic) and the K⁺ channel antagonist 4-aminopyridine (4AP) [16]. After 24 h of synaptic stimulation, neurons were washed for 30 min to block burst firing [17]. Neurons that had been previously stimulated showed increased mitochondrial membrane potential and higher basal and maximal oxygen consumption (OCR) (Figures 1A–C and S1A). Synaptic activity induces the expression of the master regulator of mitochondrial biogenesis PGC1A [18], and therefore, to study the possibility that higher OCR was due to increased mitochondrial mass, mitochondrial mass was analyzed in resting and 24 h stimulated neurons. We used two strategies, the Western blot of two commonly used mitochondrial mass markers, VDAC1 and HSP60, and the quantitative determination of mtDNA. Both techniques showed that, 24 h after synaptic stimulation, there was no change in mitochondrial mass (Figure 1D,E). In agreement with other reports [17,19,20], stimulation did not affect neuronal viability (Figure S2), ruling out the possibility of a selection of more respiratory neurons.

Hence, increased mitochondrial bioenergetics in neurons that have experienced an episode of synaptic activity is not caused by increased mitochondrial mass but by some type of mitochondrial adaptation.

2.2. Increased Intracellular Iron Levels in Active Neurons Participate in Bioenergetics Boost

Neuronal activity enhances iron uptake by the neuron [21–23]. Iron is an essential cofactor for important biochemical reactions, such as oxygen transport and energy metabolism. Hence, we analyzed intracellular iron using the ferrozine-based colorimetric assay and a fluorescent ferrous iron (Fe²⁺) sensor. Both techniques showed increased levels of intracellular iron in active neurons (Figures 2A,B and 3A). Intracellular iron is mainly used in mitochondria, where it is used for the synthesis of iron–sulfur clusters (ISC) and the heme group, which act as cofactors of multiple enzymes, including TCA cycle enzymes and OXPHOS complexes. Using a mitochondria-targeted fluorescent sensor, we observed increased levels of iron in the mitochondria of stimulated neurons (Figures 2C and 3B). Increased mitochondrial iron content in neurites was similar to that in soma (Figure S3).

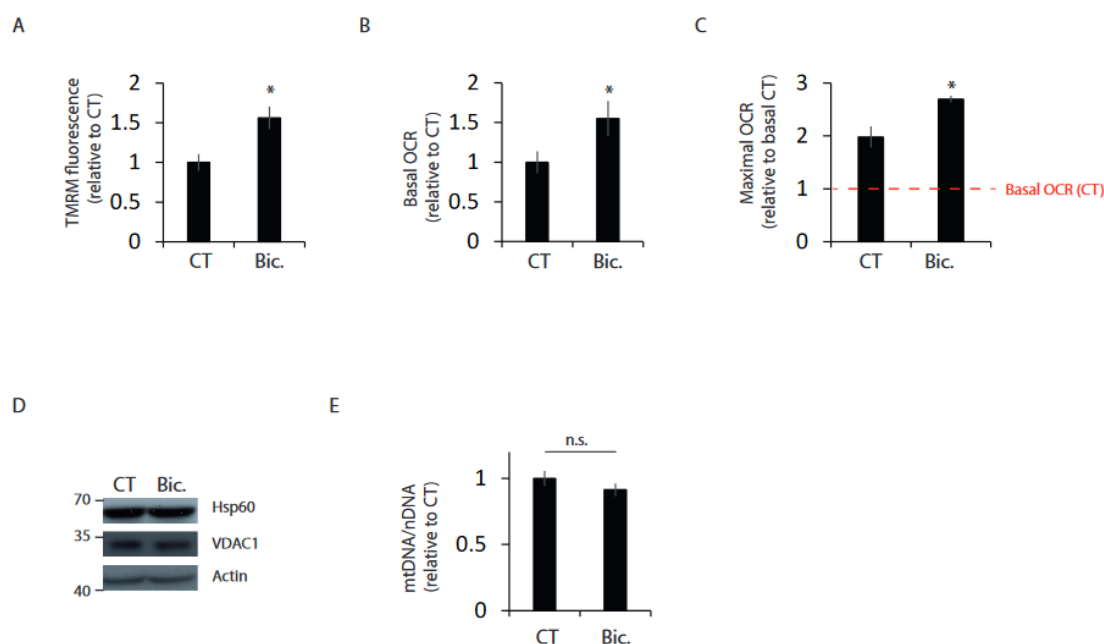


Figure 1. Synaptic activity enhances mitochondrial bioenergetics. Primary cortical neurons were stimulated with bicuculline plus 4-AP (labeled Bic in this and subsequent figures) for 24 h or left unstimulated (CT), 30 min after washing out to block burst firing: (A) mitochondrial membrane potential (MMP) was determined by measuring TMRM fluorescence ($n = 4$ independent experiments). (B) Basal and (C) maximal oxygen consumption rate (OCR) was analyzed ($n = 3$ independent experiments). (D) Representative Western blots of protein samples of control and stimulated neurons ($n = 3$ independent experiments). (E) Mitochondrial and nuclear DNA was analyzed by qPCR ($n = 4$ independent experiments). * $p < 0.05$, two-tailed Student's t -test. n.s. = non-significant.

To investigate whether an activity-mediated increase in iron levels is important for enhancing mitochondrial bioenergetics, neurons were treated with the iron chelator 2,2'-bipyridyl (bipy). Bipy treatment impaired the synaptic activity-mediated increase in basal and maximal oxygen consumption (Figure 2D,E and Figure S1B,C).

All together, these results indicate that synaptic-activity-mediated iron uptake plays an important role in enhancing neuronal bioenergetics.

2.3. Synaptic Activity Induces the Transcriptional Expression of Iron Metabolism Genes

Through the generation of Ca^{2+} transients, synaptic activity is one of the most potent regulators of gene expression [24,25]. To examine the possibility that increased iron uptake induced by synaptic activity requires the synthesis of new proteins, neurons were treated with the translation inhibitor cycloheximide (CHX), and we observed that CHX treatment completely blocked the activity-mediated rise in intracellular and mitochondrial iron (Figure 3A,B). These data suggested that transcriptional changes might be associated with increased iron uptake in neurons that have experienced synaptic activity. Therefore, we analyzed the mRNA levels of different genes involved in iron metabolism. We observed strong induction of *Mfrn1*, which mediates mitochondrial iron import, and ferroportin (*Fpn*), which mediates cellular iron export (Figure 3C). A more modest, although significant, induction was observed in transferrin receptor (*TFRC1*) gene expression, which is necessary for receptor-mediated cellular iron uptake, and *DMT1*, which mediates iron transport across the endosomal membrane to the cytosol (Figure 3C).

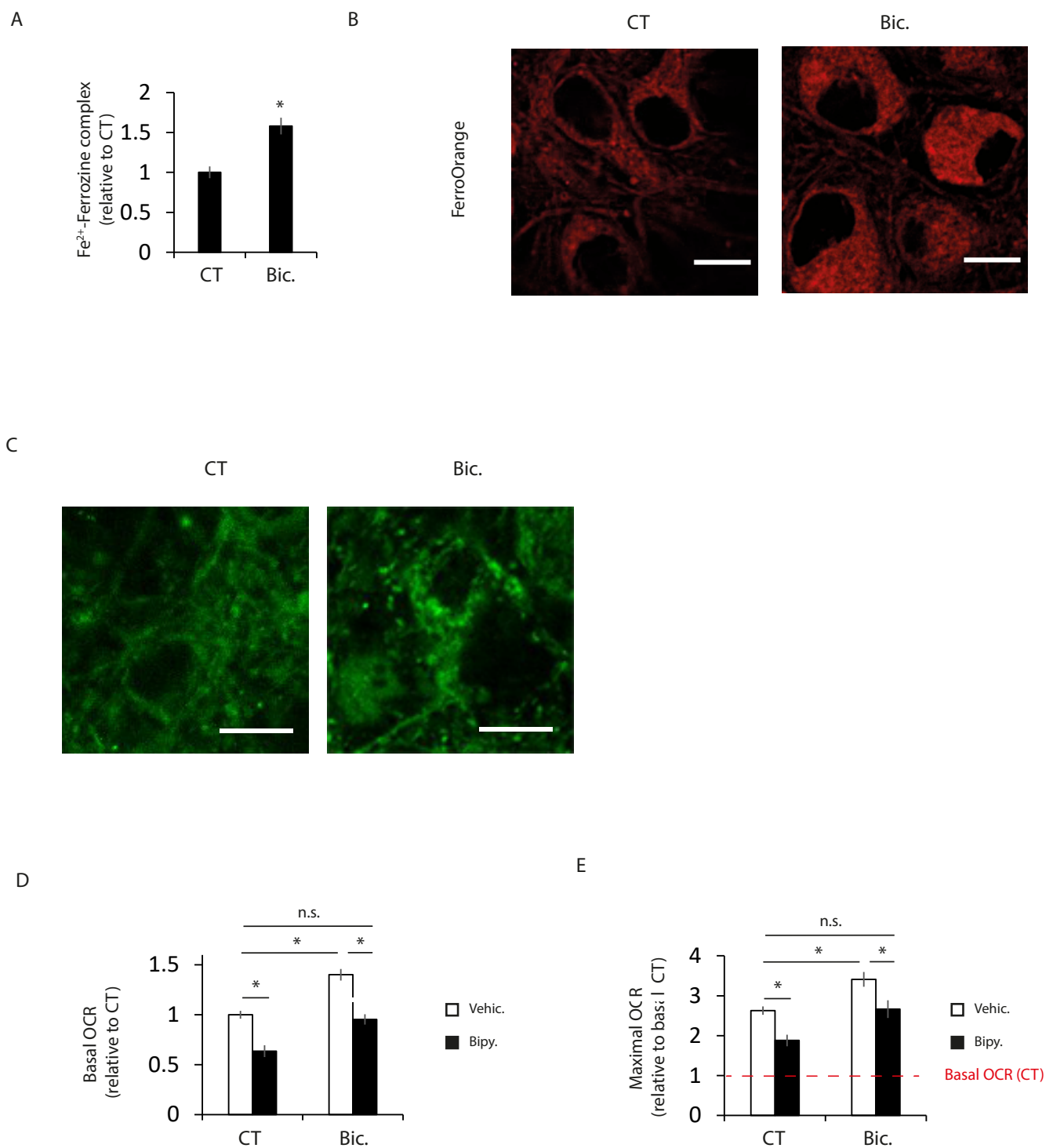


Figure 2. Increased intracellular iron levels in active neurons participate in bioenergetics boost. (A) Ferrous iron content in control unstimulated and 24 h Bic-stimulated neurons was analyzed using the ferrozine-based assay ($n = 4$ independent experiments). * $p < 0.05$, two-tailed Student's t -test. (B) Representative images of FerroOrange staining in control and stimulated neurons ($n = 3$ independent experiments). Scale bar = 10 μ m. (C) representative images of Mito-FerroGreen staining in control and stimulated neurons ($n = 4$ independent experiments). Scale bar = 10 μ m. (D) Basal and (E) maximal oxygen consumption rate (OCR) was analyzed in neurons treated with the iron chelator 2,2'-bipyridyl (bipy, 100 μ M) ($n = 4$ independent experiments). The red dashed line indicates basal OCR of resting neurons. * $p < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. n.s. = non-significant.

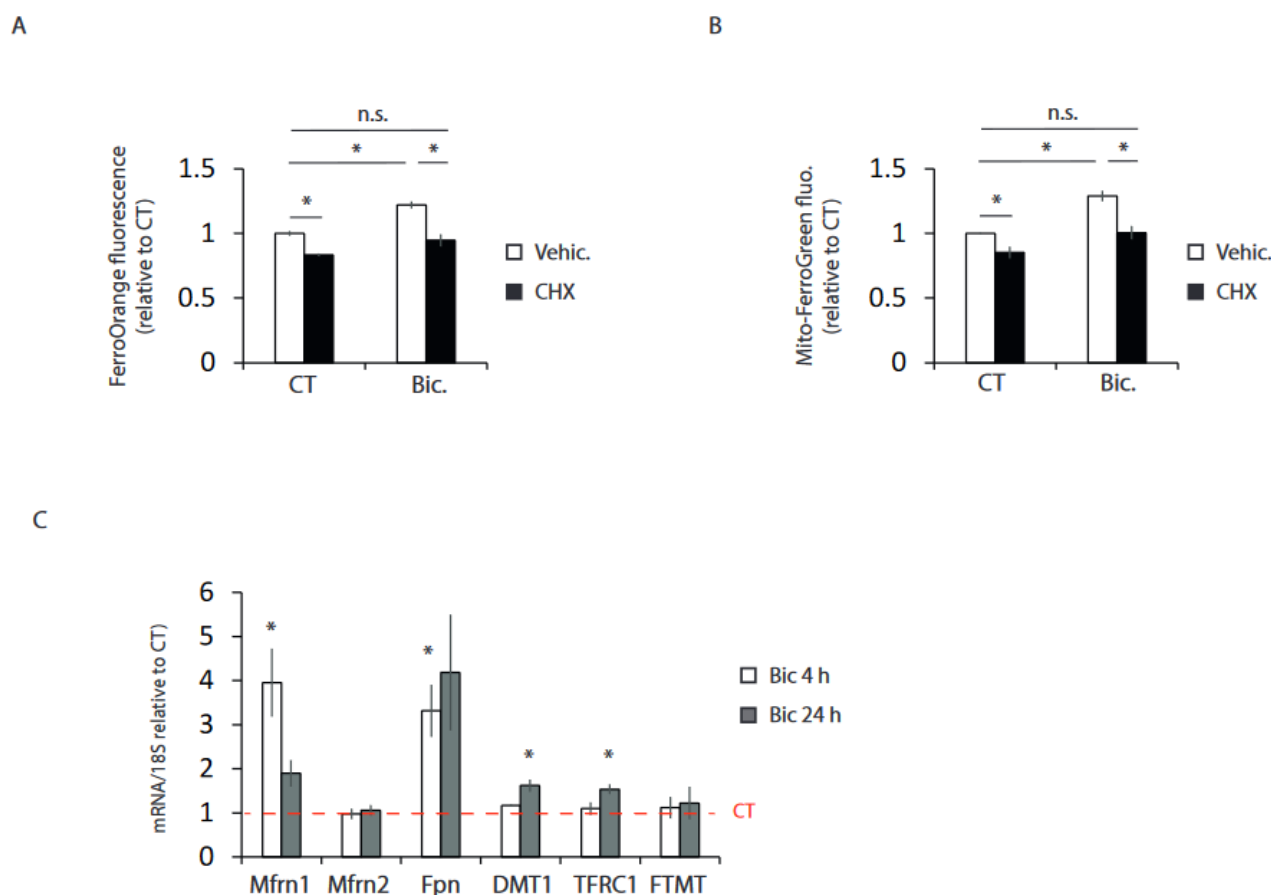


Figure 3. Synaptic activity induces the transcriptional expression of iron metabolism genes. **(A)** Cytoplasmic and **(B)** mitochondrial ferrous content was analyzed in control and 24 h stimulated neurons in absence or presence of the translation inhibitor cycloheximide (10 μ M) as indicated (n = 3 and 4 independent experiments, respectively). **(C)** Neurons were stimulated for 4 or 24 h, and mRNA expression of the indicated genes was determined by qPCR (n = 4–8 independent experiments). The red dashed line indicates mRNA levels in resting neurons * $p < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test except for Fpn and FTMT qPCR results, which used Kruskal–Wallis, followed by Dunn's post hoc test. n.s. = non-significant.

These results indicate that synaptic activity regulates the expression of iron metabolism genes in a coordinated manner.

2.4. Mfrn1 Knockdown Impairs Mitochondrial Bioenergetics

Mitochondria is the major site of iron utilization, and it acts as a cofactor of different proteins involved in bioenergetics. Thus, we knocked down Mfrn1 using an AAV expressing a shRNA targeting Mfrn1 (AAV-shMfrn1) in order to study whether blockage of increased iron uptake induced by synaptic activity also impaired the enhancement of bioenergetics. As a functional consequence of the blockage of activity-dependent induction of Mfrn1 by AAV-shMfrn1 (Figure 4A), Mfrn1 KD neurons showed reduced mitochondrial iron levels (Figure 4B). Mfrn1 KD neurons showed diminished mitochondrial bioenergetics enhancement after stimulation (Figures 4C,D and S1D,E), further supporting the view that an increase in iron metabolism is necessary to fully enhance mitochondrial bioenergetics in active neurons.

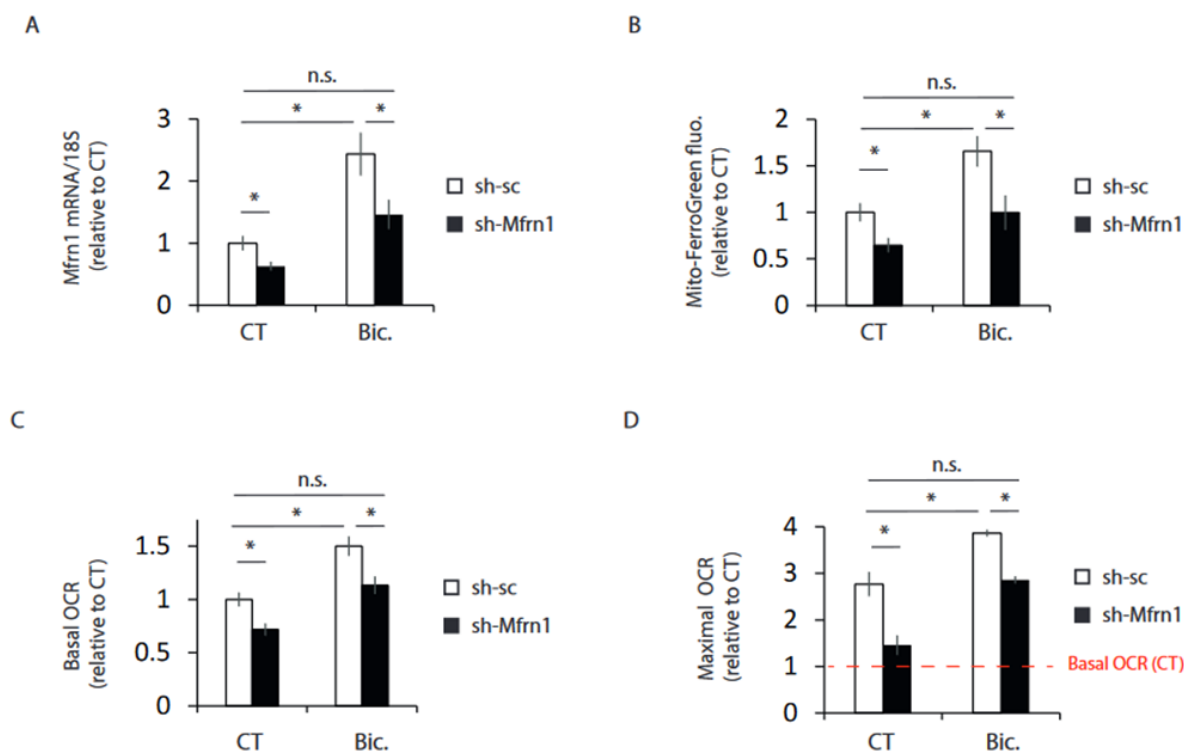


Figure 4. Mfrn1 knockdown impairs mitochondrial bioenergetics. Neurons transduced with AAV expressing shRNA targeting Mfrn1 (shMfrn1) or control non-targeting shRNA (shsc). (A) After 4 h stimulation with Bic, Mfrn1 mRNA expression was determined by qPCR ($n = 6$ independent experiments). (B) Mitochondrial ferrous content was analyzed in control, and 24 h stimulated neurons transduced with an AAV expressing a shRNA targeting Mfrn1 (shMfrn1) or a non-targeting shRNA (shsc) as indicated ($n = 4$ independent experiments). (C) Basal OCR and (D) maximal OCR was determined after 24 h stimulation with Bic ($n = 5$ independent experiments). The red dashed line indicates basal OCR of resting neurons. * $p < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. n.s. = non-significant.

2.5. Mfrn1 Is Regulated by CREB

Since blocking Mfrn1 induction is sufficient to impair the activity-dependent enhancement of mitochondrial respiratory capacity, we next aimed to identify the transcription factor that regulates Mfrn1 induction in active neurons. The expression pattern of Mfrn1 after stimulation resembles that of CREB-dependent activity-regulated genes [17,26,27]. CREB is one of the most studied transcription factors involved in synaptic activity-regulated transcriptional changes, which are involved in important neurobiological processes, such as memory, learning and neuronal survival [24,25,28]. CREB also regulate the expression of genes involved in the metabolism in neurons and peripheral tissues [17,29,30]. Synaptic activity causes CREB activation initiated by calcium flux through the NMDA receptor (NMDAR) [19]. In agreement with a possible role of CREB regulating the activity-mediated induction of Mfrn1, we first observed that the NMDAR antagonist MK-801 blocked activity dependent induction of Mfrn1 (Figure 5A). In addition, a small but significant induction of Mfrn1 mRNA was observed after just 30 min of stimulation (Figure 5B), consistent with the rapid CREB activation triggered by synaptic activity [16,31–33]. Therefore, we reasoned that CREB might regulate Mfrn1 in active neurons. We first treated neurons with the adenylyl cyclase activator and thus, CREB activator, forskolin. Forskolin treatment was sufficient to induce Mfrn1 (Figure 5C), suggesting that CREB regulates Mfrn1 expression.

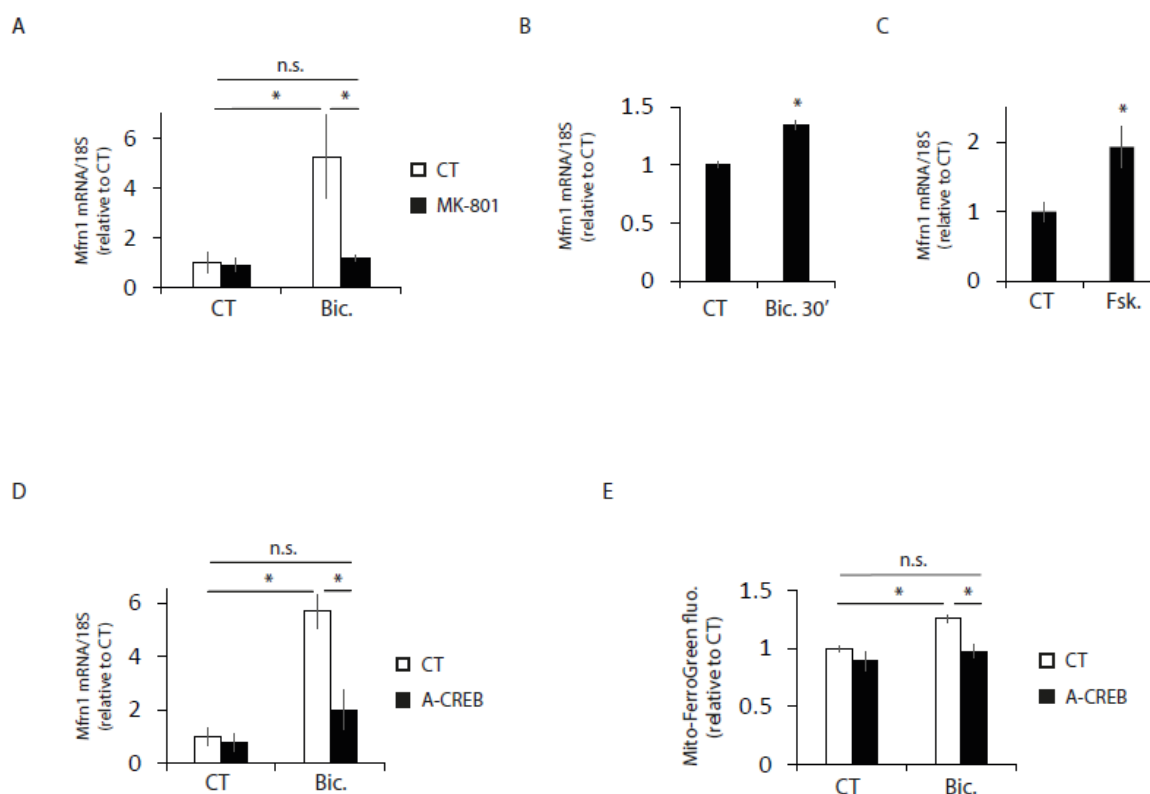


Figure 5. Mfrn1 is regulated by CREB. (A) Neurons were stimulated with Bic for 4 h with or without MK-801 (10 μ M), and Mfrn1 mRNA expression was determined by qPCR ($n = 5$ independent experiments). * $p < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. (B) Neurons were stimulated for 30 min, and Mfrn1 mRNA expression was determined by qPCR ($n = 4$ independent experiments). * $p < 0.05$, two-tailed Student's t -test. (C) Neurons were treated with forskolin (FSK, 10 μ M) for 4 h, and Mfrn1 mRNA expression was determined by qPCR ($n = 4$ independent experiments). * $p < 0.05$, two-tailed Student's t -test. (D) Neurons were transduced with AAV encoding the dominant negative A-CREB, and after 4 h stimulation with Bic Mfrn1, mRNA expression was determined by qPCR ($n = 3$ independent experiments). * $p < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. (E) Analysis of Mito-FerroGreen fluorescence intensity in CT and AAV-CREB transduced neurons left unstimulated or stimulated with Bic for 24 h. ($n = 3$ independent experiments). * $p < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. n.s. = non-significant.

To confirm that CREB is the transcription factor by which synaptic activity induces Mfrn1, we transduced neurons with AAV expressing A-CREB, which is CREB dominant negative [34], and observed that the activity-mediated induction of Mfrn1 expression was blocked (Figure 5D). Consistent with the role of CREB in regulating activity-dependent Mfrn1 expression, we observed that A-CREB expression abolished the activity-dependent enhancement of mitochondrial iron uptake (Figure 5E). Hence, these results identify Mfrn1 as a new CREB target gene in active neurons that contributes to enhancing mitochondrial bioenergetics.

3. Discussion

In this study, we show that the mitochondria of neurons that have experienced synaptic activity display enhanced bioenergetics that last beyond the period of activity. The bioenergetics enhancement requires increased mitochondrial iron uptake, which is essential in complexes of the OXPHOS system [12].

Processes related to synaptic activity, such as the restoration of ionic gradients or synaptic vesicle recycling, require a huge energetic effort on the part of the neuron [1]. There are different mechanisms for dealing with this energetic stress meanwhile the synaptic

activity takes place. For instance, an activity-dependent increase in Ca^{2+} keeps motile mitochondria at presynaptic sites to produce energy where it is most needed [35–37]. However, the activity-dependent increase in Ca^{2+} is transient, and once cytoplasmic Ca^{2+} levels are stabilized, mitochondria can restart movement. In addition, it has been shown that synaptic activity activates the master sensor of energy stress AMPK, which regulates glycolysis and mitochondrial respiration to increase energy production during synaptic activity [38,39]. Moreover, synaptic activity causes the translocation of the glucose transporter Glut4 to cell membrane to increase glucose levels [40], but the membrane translocation/endocytosis rates are likely to be restored towards intracellular retention once the translocation stimulus ceases, as in peripheral tissues [41]. In as short as an hour after stimulation, Rheb expression is induced and translocated to the mitochondrial matrix, where it enhances the activity of mitochondrial pyruvate dehydrogenase [42]. However, the long-lasting effects of synaptic activity on neuronal metabolism have been poorly studied. The surface of mitochondria crista strongly correlates with bioenergetics capacity. Indeed, the remodelling of crista architecture takes place as a response to increased energy demand [43,44]. An ultrastructural study of mitochondria of fast-spiking parvalbumin-positive basket cells and slow firing type-1 cannabinoid-positive basket cells showed higher crista density in the fast-spiking neurons, suggesting the activity-dependent ultrastructural remodeling of mitochondria [45]. Proteomics analysis showed differences in proteins of synaptic and non-synaptic mitochondria [46], although care must be taken in the interpretation of these findings, since in the analyzed samples, non-synaptic mitochondria were not limited to neuronal mitochondria but also included glia and other non-neuronal brain cells mitochondria. In this study, we have shown a novel mechanism by which an episode of synaptic activity enhances mitochondrial metabolism, although activity has ceased, based on increasing mitochondrial iron levels, which is a necessary component of the electron transport complexes in the mitochondria.

Brain development and cognitive function requires a high amount of energy, and iron is necessary for proper mitochondrial function. Consequently, iron deficiency during late fetal and early postnatal life causes learning and memory impairments [47–50]. Moreover, iron is an essential metal that functions as a cofactor of different enzymes involved in neurotransmitter synthesis, and in oligodendrocytes, it is required for myelination [51,52]. Therefore, iron is necessary for proper brain function. However, an excess of iron is associated with aging and neurodegenerative disorders [6,53]. Iron can participate in the production of reactive oxygen species (ROS) and iron-dependent lipid peroxidation via the Fenton reaction, causing a regulated type of cell death known as ferroptosis [54], in which one of the hallmarks is the accumulation of iron in cells [55]. Ferroptosis and iron accumulation have been reported in neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Friedreich's ataxia, among others [6,53]. Therefore, cellular iron levels need to be tightly regulated. Herein, we show that synaptic activity induces, at a transcriptional level, the expression of genes involved in intracellular iron import (TRFC1), transport from endosome to cytosol (DMT1) and mitochondrial iron uptake (Mfrn1), but synaptic activity also strongly induces the expression of Fpn that mediates cellular iron efflux. This apparent contradiction (simultaneous induction of iron uptake and efflux genes) might represent a defense mechanism against ferroptosis by achieving balanced intracellular iron levels. Indeed, loss of Fpn causes ferroptosis [56,57], and the enhancement of cellular iron export make cells more resistant to ferroptosis [58,59]. In addition to the upregulation of Fpn, active neurons also induce, at the transcriptional level, the expression of the system xc- cysteine-glutamate antiporter and glutathione synthesis, which is the main ferroptosis-controlling pathway [60–62]. All this suggests that synaptic activity, while increasing intracellular iron levels, coordinately regulates a transcriptional program to protect against ferroptosis, as occurs with other regulated cell death subroutines [63–66]. However, additional studies are needed to confirm this.

By activating different transcription factors, synaptic activity is one of the strongest inducers of gene expression [24]. Our data indicate that CREB is the transcription factor

responsible for the activity-dependent induction of Mfrn1 expression. In neurons, CREB has mainly been studied in relation to its role as a regulator of plasticity, cell survival, and neurite outgrowth [24,25,28,67]. All these processes require increasing energy demands. The role of CREB in regulating the expression of metabolic genes has been studied mainly in peripheral tissues [29], although in neurons, it also has been described a metabolic role of CREB by regulating the expression of Glut3 [17,30], the main glucose transporter in neurons, and indirectly regulating rate-limiting glycolysis genes [17]. Herein, we show that the CREB-dependent induction of Mfrn1 is needed to enhance mitochondrial bioenergetics, preparing neurons for dealing with the energetic stresses associated with synaptic activity. In accordance with our results, a very recent study showed the regulation of Mfrn1 expression by CREB in the hepatoma PLC cell line [68]. Thus, our and others results suggest that CREB regulates in a coordinated manner the expression of genes important for neuronal function and the expression of bioenergetic genes necessary to satisfy the high energetic requirements of these neuronal processes.

In conclusion, we have unveiled a mechanism by which synaptic activity enhances mitochondrial bioenergetics beyond the period of activity, which may be relevant to dealing with the increasing energetic demand associated with synaptic activity.

4. Methods

4.1. Cell Culture and Stimulation

Cortical neurons from E21 Sprague Dawley rats were cultured in NBA (Neurobasal A medium + B27, 1% FBS and 1 mM glutamine) as described previously [69]. Experiments were performed after 10–11 days in culture, during which cortical neurons develop a rich network of processes, express functional NMDA-type and AMPA/kainate-type glutamate receptors, and form synaptic contacts. Bursts of action potential firing were induced by treating neurons with 50 μ M bicuculline (Merck, Sigma-Aldrich, Burlington, VT, USA), and burst frequency was enhanced by adding 250 μ M 4-amino pyridine (Merck, Sigma-Aldrich, Burlington, VT, USA).

4.2. Transfection, Plasmids and Virus Generation

Prior to transfection, neurons were transferred from growth medium to a medium composed of 10% MEM (Invitrogen) and 90% salt–glucose–glycine (SGG) medium (SGG: 114 mM NaCl, 0.219% NaHCO₃, 5.292 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM glycine, 30 mM glucose, 1 mM glutamine, 0.5 mM sodium pyruvate, 0.1% phenol red; osmolarity 325 mosm/L). Neurons were transfected at DIV8 using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Transfection efficiency was approximately 5%, with almost all transfected cells being neurons.

The vectors used to construct and package recombinant adeno-associated viruses (rAAVs), pAAV-sh-sc, were kindly provided by Hilma Bading [70]. rAAV for shRNA expression contains the U6 promoter for shRNA expression and a CMV/chicken beta-actin hybrid promoter driving hrGFP expression. rAAV-shMfrn1 was made by swapping the sh-sc sequence of rAAV-sh-sc for the following sequence of the rat gene into the BamHI and HindIII restriction sites: 5'-GCC TGA ACG TGA TGA TGA T-3'.

A-CREB [70] was amplified using the following primers: A-CREB-F: 5'- TTTA GAT CTG CCA CCA TGG ACT ACA AGG ACG-3' and -R: 5'- TTT TCC GGA ATC TGA CTT GTG GCA GTA AAG GTC-3'. The amplified product contains sequences with BglII and BspEI restriction sites at the 5' and 3', respectively (italics). A BspEI restriction site was introduced before the P2A sequence in AAV-hSyn1-GCaMP6f-P2A-NLS-d-Tomato (Addgene plasmid #51085; <http://n2t.net/addgene:51085> accessed on 30 December 2022; RRID:Addgene_51085; a gift from Jonathan Ting), GCaMP6f was removed by digestion with BamHI and BspEI, and amplified A-CREB was cloned into this linearized vector.

Neurons were infected with rAAV at DIV4. Infection efficiencies were determined at DIV 10–11 by analyzing GFP or d-Tomato fluorescence or conducting an immunocytochemical analysis and were observed to range from 70 to 85% of the viable neurons.

All newly generated constructs were confirmed by sequencing.

4.3. RNA Isolation, RT-PCR and qPCR

RNA was isolated using a PureLink™ RNA mini kit (Thermo Fisher, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). For qPCR; cDNA was synthesized from RNA using the SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Thermo Fisher, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions. qPCR was performed in a StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher, Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA) using GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The primers used were:

Mfrn1 -F: 5'- gta tgg cca ccc tac tcc ac -3', -R: 5'- gca atc gct gtt tca cca c -3'; Mfrn2 -F: 5'- gga tgt gtg gca acg tta ctt -3', -R: 5'- tcc gct gct tga cca ctt -3'; FPN -F: 5'- gca aac tac ctg acc tca gca -3', -R: 5'- act gca aag tgc cac atc c -3'; DMT1 -F: 5'- cgg cca gtg atg agt gag t -3', -R: 5'- agc aga cga gaa gga cca ag -3'; TFRC1-F: 5'- ccc ttc tcg aga tgc aac at-3', -R: 5'- tcc agc ctc acg agg agt at-3'; FTMT -F: 5'- gcc aga act ttc acc cag ac -3', -R: 5'- gga tgc gta aag ctc cat gt-3'; 18S -F: 5'-GTG GAG CGA TTT GTC TGG TT-3', -R: 5'-CAA GCT TAT GAC CCG CAC TT-3'. Expression of the gene of interest was normalized to that of 18S rRNA, a commonly used control.

For analysis of mtDNA/nDNA total DNA was isolated with the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Real-time qPCR was performed with primers mt-COXI -F: 5'- GCT TCG TCC ACT GAT TCC CA -3', -R: 5'- GCA AAG TGG GCT TTT GCT CA -3' and nFabp1: -F: 5'- ATG GGC CAC GAT CTG TCT TC -3', -R: 5'- GTG GCA AGA CCA GAG TGT CA -3' to amplify mitochondrial and nuclear DNA, respectively.

4.4. Western Blotting and Antibodies

Total cell lysates were boiled at 100 °C for 5 min in 1.5× sample buffer (1.5 M Tris pH 6.8; 15% glycerol; 3% SDS; 7.5% β-mercaptoethanol; 0.0375% bromophenol blue). Gel electrophoresis was performed using 9% polyacrylamide gels. The gels were blotted onto PVDF membranes, which were then blocked for 1 h at room temperature with 5% (w/v) non-fat dried milk in PBS with 0.05% Tween 20. The membranes were then incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies diluted in blocking solution as follows: VDAC1 (1:1000; Ab14734; Abcam, Cambridge, UK), HSP60 (1:2000; Ab190828; Abcam) and actin (1:1000, A4700, Merck, Sigma-Aldrich, Burlington, VT, USA). To visualize Western blots, HRP-based secondary antibodies were used, followed by chemiluminescent detection on Kodak X-Omat film.

4.5. Oxygen Consumption Assay

Extracellular oxygen consumption was measured using the MitoXpres Xtra Oxygen Consumption Assay kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were grown in 96-well plates to confluence. Before the assay, the culture medium was replaced with fresh NBA plus MitoXpress Xtra reagent (diluted 1:10), and two drops of mineral oil were promptly added. Plates were read at 380 nm excitation and 650 nm emission, every minute for 3 h. Maximal OCR was assayed after the addition of CCCP (10 μM). For analysis, after an initial decrease in fluorescence due to O₂ back diffusion through the body of the microplate reader [71] the fluorescence signal started to increase in a linear fashion for at least the next two hours. Fluorescence values were plotted against time, and the slope of the linear portion was determined. The values were normalized by total protein levels, quantified using a Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA).

4.6. Analysis of Mitochondrial Membrane Potential

To quantify MMP, cells were loaded for 30 min at 37 °C with tetramethylrhodamine methylester (TMRM; Merck, Sigma-Aldrich, Burlington, VT, USA) at a non-quenching concentration (6 nM) in phenol red-free HBSS with 10 mM HEPES and 5.5 mM glucose (Gibco,

14025-050; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Single cells were monitored, TMRM was excited at 540 nm, and emission was measured using a 570 nm filter. Background values obtained after mitochondrial depolarization with CCCP (10 μ M, the concentration that in titration experiments completely depolarized mitochondria) were subtracted from the TMRM fluorescence values.

4.7. Measurement of Cellular and Mitochondrial Iron Levels

Iron content was measured using a colorimetric ferrozine-based assay. Cell lysate mixed with concentrated HCl (11.6 M) was heated at 95 °C for 20 min and then centrifuged at 12,000 $\times$ g for 10 min. Ascorbate was added to the supernatant, and, after 2 min of incubation at room temperature, ferrozine and saturate ammonium acetate (NH₄Ac) were sequentially added. The absorbance was measured at 570 nm. The values were normalized by total protein levels, quantified using a Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA).

FerroOrange (Dojindo) and Mito-FerroGreen (Dojindo) were used to measure the amount of intracellular and mitochondrial ferrous iron (Fe²⁺) content, respectively, according to the manufacturer's instructions. Briefly, neurons were incubated for 30 min at 37 °C with FerroOrange at 1 μ mol/L or Mito-FerroGreen at 5 μ mol/L in HBSS. The fluorescence signals (Ex/Em = 543 nm/580 nm for FerroOrange and 488/550 nm for Mito-FerroGreen) were measured on a Leica confocal laser scanning microscope (Life Imaging Services, Basel, Switzerland). Before the observation of Mito-FerroGreen, neurons were washed three times with HBSS. ROIs of the same surface were drawn in the soma, and fluorescence intensity was analyzed using ImageJ [72]. Fluorescence intensity in resting and neurons that have experienced an episode of synaptic activity was within the range obtained when neurons were treated with ammonium iron (II) sulfate (100 μ M) and treated with the iron chelator bipyridyl (100 μ M).

4.8. Statistical Analysis

Normal distribution of samples was tested using a Shapiro–Wilk test. For normal distributed data, statistical testing involved two-tailed Student *t*-tests for comparisons of two groups or for multiple comparisons within data sets, we used one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. For nonparametric multiple comparisons test, we used Kruskal–Wallis, followed by Dunn's posthoc test. All data are presented as mean $\pm$ S.E.M. of at least three independent experiments (n).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24020922/s1>.

Author Contributions: Conceptualization: F.X.S.; Methodology: P.T.-M., G.R.-P. and C.M.-S.; Formal analysis: P.T.-M., G.R.-P., C.M.-S., M.R., O.M.M.-E. and F.X.S.; Investigation: P.T.-M., G.R.-P. and C.M.-S.; Writing: F.X.S.; Supervision: F.X.S.; Funding acquisition: O.M.M.-E. and F.X.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 grant number PID2020-119322GB-I00 to F.X.S. and PID2020-119315GB-I00 to O.M.M.-E., Fundació La Marató de TV3 grant number 202030-31 to F.X.S. and "La Caixa Foundation" grant number LCF/PR/HR17 to O.M.M.-E.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona (OB 395/18 26 July 2018).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: This study includes no data deposited in external repositories. The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: G.R.-P. is the recipient of a PREDOCS-UB fellowship from the UB. The Institute of Neurosciences of the University of Barcelona is a María de Maeztu Unit of Excellence, MDM-2017-0729, Ministry of Science, Innovation and Universities.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Harris, J.J.; Jolivet, R.; Attwell, D. Synaptic Energy Use and Supply. *Neuron* **2012**, *75*, 762–777. [\[CrossRef\]](#)
- Nicoll, R.A. A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron* **2017**, *93*, 281–290. [\[CrossRef\]](#)
- Boumezbeur, F.; Mason, G.F.; de Graaf, R.A.; Behar, K.L.; Cline, G.W.; Shulman, G.I.; Rothman, D.L.; Petersen, K.F. Altered Brain Mitochondrial Metabolism in Healthy Aging as Assessed by in vivo Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, *30*, 211–221. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mattson, M.P.; Arumugam, T. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 1176–1199. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhang, S.; Xin, W.; Anderson, G.J.; Li, R.; Gao, L.; Chen, S.; Zhao, J.; Liu, S. Double-edge sword roles of iron in driving energy production versus instigating ferroptosis. *Cell Death Dis.* **2022**, *13*, 40. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rouault, T.A. Iron metabolism in the CNS: Implications for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 551–564. [\[CrossRef\]](#)
- Richardson, D.R.; Lane, D.J.; Becker, E.M.; Huang, M.L.; Whitnall, M.; Suryo Rahmanto, Y.; Sheftel, A.D.; Ponka, P. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 10775–10782. [\[CrossRef\]](#)
- Shaw, G.C.; Cope, J.J.; Li, L.; Corson, K.; Hersey, C.; Ackermann, G.E.; Gwynn, B.; Lambert, A.J.; Wingert, R.A.; Traver, D.; et al. Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* **2006**, *440*, 96–100. [\[CrossRef\]](#)
- Abboud, S.; Haile, D. A Novel Mammalian Iron-regulated Protein Involved in Intracellular Iron Metabolism. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19906–19912. [\[CrossRef\]](#)
- Donovan, A.; Brownlie, A.; Zhou, Y.; Shepard, J.; Pratt, S.J.; Moynihan, J.; Paw, B.H.; Drejer, A.; Barut, B.; Zapata, A.; et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **2000**, *403*, 776–781. [\[CrossRef\]](#)
- McKie, A.T.; Marciani, P.; Rolfs, A.; Brennan, K.; Wehr, K.; Barrow, D.; Miret, S.; Bomford, A.; Peters, T.J.; Farzaneh, F.; et al. A Novel Duodenal Iron-Regulated Transporter, IREG1, Implicated in the Basolateral Transfer of Iron to the Circulation. *Mol. Cell* **2000**, *5*, 299–309. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kim, H.J.; Khalimonchuk, O.; Smith, P.M.; Winge, D.R. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 1604–1616. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lill, R.; Hoffmann, B.; Molik, S.; Pierik, A.J.; Rietzschel, N.; Stehling, O.; Uzarska, M.A.; Webert, H.; Wilbrecht, C.; Mühlenhoff, U. The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 1491–1508. [\[CrossRef\]](#)
- Bastian, T.W.; von Hohenberg, W.C.; Mickelson, D.J.; Lanier, L.M.; Georgieff, M.K. Iron Deficiency Impairs Developing Hippocampal Neuron Gene Expression, Energy Metabolism, and Dendrite Complexity. *Dev. Neurosci.* **2016**, *38*, 264–276. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, Y.C.; Wu, Y.; Wei, Y. Depletion of mitoferrins leads to mitochondrial dysfunction and impairment of adipogenic differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *Free. Radic. Res.* **2015**, *49*, 1285–1295. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hardingham, G.E.; Arnold, F.; Bading, H. Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 261–267. [\[CrossRef\]](#)
- Segarra-Mondejar, M.; Casellas-Díaz, S.; Ramiro-Pareta, M.; Müller-Sánchez, C.; Martorell-Riera, A.; Hermelo, I.; Reina, M.; Aragonés, J.; Martínez-Estrada, O.M.; Soriano, F.X. Synaptic activity-induced glycolysis facilitates membrane lipid provision and neurite outgrowth. *EMBO J.* **2018**, *37*, e97368. [\[CrossRef\]](#)
- Soriano, F.X.; Léveillé, F.; Papadia, S.; Bell, K.F.; Puddifoot, C.; Hardingham, G.E. Neuronal activity controls the antagonistic balance between peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α and silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors in regulating antioxidant defenses. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14*, 1425–1436. [\[CrossRef\]](#)
- Hardingham, G.E.; Fukunaga, Y.; Bading, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 405–414. [\[CrossRef\]](#)
- Zhou, X.; Hollern, D.; Liao, J.; Andrechek, E.; Wang, H. NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e560. [\[CrossRef\]](#)
- Cheah, J.H.; Kim, S.F.; Hester, L.D.; Clancy, K.W.; Patterson, S.E., 3rd; Papadopoulos, V.; Snyder, S.H. NMDA Receptor-Nitric Oxide Transmission Mediates Neuronal Iron Homeostasis via the GTPase Dexas1. *Neuron* **2006**, *51*, 431–440. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pelizzoni, I.; Maccò, R.; Morini, M.F.; Zacchetti, D.; Grohovaz, F.; Codazzi, F. Iron handling in hippocampal neurons: Activity-dependent iron entry and mitochondria-mediated neurotoxicity. *Aging Cell* **2011**, *10*, 172–183. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gaasch, J.A.; Geldenhuys, W.J.; Lockman, P.R.; Allen, D.D.; Van der Schyf, C.J. Voltage-gated Calcium Channels Provide an Alternate Route for Iron Uptake in Neuronal Cell Cultures. *Neurochem. Res.* **2007**, *32*, 1686–1693. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Greer, P.L.; Greenberg, M. From Synapse to Nucleus: Calcium-Dependent Gene Transcription in the Control of Synapse Development and Function. *Neuron* **2008**, *59*, 846–860. [\[CrossRef\]](#)
- Bading, H. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 593–608. [\[CrossRef\]](#)
- Van de Velde, S.; Hogan, M.; Montminy, M. mTOR links incretin signaling to HIF induction in pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16876–16882. [\[CrossRef\]](#)

27. Mayr, B.; Montminy, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 599–609. [\[CrossRef\]](#)
28. Lonze, B.E.; Ginty, D.D. Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron* **2002**, *35*, 605–623. [\[CrossRef\]](#)
29. Altarejos, J.Y.; Montminy, M. CREB and the CRTC co-activators: Sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 141–151. [\[CrossRef\]](#)
30. Rajakumar, A.; Thamotharan, S.; Raychaudhuri, N.; Menon, R.K.; Devaskar, S.U. Trans-activators Regulating Neuronal Glucose Transporter Isoform-3 Gene Expression in Mammalian Neurons. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26768–26779. [\[CrossRef\]](#)
31. Lam, B.Y.H.; Zhang, W.; Enticknap, N.; Haggis, E.; Cader, M.Z.; Chawla, S. Inverse Regulation of Plasticity-related Immediate Early Genes by Calcineurin in Hippocampal Neurons. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 12562–12571. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Lee, B.; Butcher, G.Q.; Hoyt, K.R.; Impey, S.; Obrietan, K. Activity-Dependent Neuroprotection and cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): Kinase Coupling, Stimulus Intensity, and Temporal Regulation of CREB Phosphorylation at Serine 133. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 1137–1148. [\[CrossRef\]](#)
33. Deisseroth, K.; Bito, H.; Tsien, R. Signaling from Synapse to Nucleus: Postsynaptic CREB Phosphorylation during Multiple Forms of Hippocampal Synaptic Plasticity. *Neuron* **1996**, *16*, 89–101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Ahn, S.; Olive, M.; Aggarwal, S.; Krylov, D.; Ginty, D.D.; Vinson, C. A Dominant-Negative Inhibitor of CREB Reveals that It Is a General Mediator of Stimulus-Dependent Transcription of c-fos. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 967–977. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Rintoul, G.L.; Filiano, A.J.; Brocard, J.B.; Kress, G.J.; Reynolds, I.J. Glutamate Decreases Mitochondrial Size and Movement in Primary Forebrain Neurons. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 7881–7888. [\[CrossRef\]](#)
36. Wang, X.; Schwarz, T.L. The Mechanism of Ca²⁺-Dependent Regulation of Kinesin-Mediated Mitochondrial Motility. *Cell* **2009**, *136*, 163–174. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. MacAskill, A.F.; Rinholm, J.E.; Twelvetrees, A.E.; Arancibia-Carcamo, I.L.; Muir, J.; Fransson, A.; Aspenstrom, P.; Attwell, D.; Kittler, J.T. Miro1 Is a Calcium Sensor for Glutamate Receptor-Dependent Localization of Mitochondria at Synapses. *Neuron* **2009**, *61*, 541–555. [\[CrossRef\]](#)
38. Li, S.; Xiong, G.J.; Huang, N.; Sheng, Z.H. The cross-talk of energy sensing and mitochondrial anchoring sustains synaptic efficacy by maintaining presynaptic metabolism. *Nat. Metab.* **2020**, *2*, 1077–1095. [\[CrossRef\]](#)
39. Marinangeli, C.; Didier, S.; Ahmed, T.; Caillerez, R.; Domise, M.; Laloux, C.; Bégard, S.; Carrier, S.; Colin, M.; Marchetti, P.; et al. AMP-Activated Protein Kinase Is Essential for the Maintenance of Energy Levels during Synaptic Activation. *iScience* **2018**, *9*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
40. Ashrafi, G.; Wu, Z.; Farrell, R.J.; Ryan, T.A. GLUT4 Mobilization Supports Energetic Demands of Active Synapses. *Neuron* **2017**, *93*, 606–615.e3. [\[CrossRef\]](#)
41. Leto, D.; Saltiel, A. Regulation of glucose transport by insulin: Traffic control of GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 383–396. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Yang, W.; Pang, D.; Chen, M.; Du, C.; Jia, L.; Wang, L.; He, Y.; Jiang, W.; Luo, L.; Yu, Z.; et al. Rheb mediates neuronal-activity-induced mitochondrial energetics through mTORC1-independent PDH activation. *Dev. Cell* **2021**, *56*, 811–825.e6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Patten, D.A.; Wong, J.; Khacho, M.; Soubannier, V.; Mailloux, R.J.; Pilon-Larose, K.; MacLaurin, J.G.; Park, D.S.; McBride, H.M.; Trinkle-Mulcahy, L.; et al. OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *EMBO J.* **2014**, *33*, 2676–2691. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Hackenbrock, C.R. Ultrastructural Bases for Metabolically Linked Mechanical Activity in Mitochondria: I. Reversible Ultrastructural Changes with Change in Metabolic Steady State in Isolated Liver Mitochondria. *J. Cell Biol.* **1966**, *30*, 269–297. [\[CrossRef\]](#)
45. Cserép, C.; Pósfai, B.; Schwarcz, A.D.; Dénes, Á. Mitochondrial Ultrastructure Is Coupled to Synaptic Performance at Axonal Release Sites. *eNeuro* **2018**, *5*, ENEURO.0390-17.2018. [\[CrossRef\]](#)
46. Völgyi, K.; Gulyássi, P.; Háden, K.; Kis, V.; Badics, K.; Kékesi, K.A.; Simor, A.; Györfy, B.; Tóth, E.A.; Lubec, G.; et al. Synaptic mitochondria: A brain mitochondria cluster with a specific proteome. *J. Proteom.* **2015**, *120*, 142–157. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Bastian, T.W.; Rao, R.; Tran, P.V.; Georgieff, M.K. The Effects of Early-Life Iron Deficiency on Brain Energy Metabolism. *Neurosci. Insights* **2020**, *15*, 2633105520935104. [\[CrossRef\]](#)
48. Lozoff, B. Iron Deficiency and Child Development. *Food Nutr. Bull.* **2007**, *28* (Suppl. 4), S560–S571. [\[CrossRef\]](#)
49. Lozoff, B.; Jimenez, E.; Wolf, A. Long-Term Developmental Outcome of Infants with Iron Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 687–694. [\[CrossRef\]](#)
50. Pivina, L.; Semenova, Y.; Doşa, M.D.; Dauletyarova, M.; Bjørklund, G. Iron Deficiency, Cognitive Functions, and Neurobehavioral Disorders in Children. *J. Mol. Neurosci.* **2019**, *68*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
51. Hidalgo, C.; Núñez, M. Calcium, iron and neuronal function. *IUBMB Life* **2007**, *59*, 280–285. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Stephenson, E.; Nathoo, N.; Mahjoub, Y.; Dunn, J.F.; Yong, V.W. Iron in multiple sclerosis: Roles in neurodegeneration and repair. *Nat. Rev. Neurol.* **2014**, *10*, 459–468. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Ward, R.J.; Zucca, F.A.; Duyn, J.H.; Crichton, R.R.; Zecca, L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* **2014**, *13*, 1045–1060. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

54. Dixon, S.J.; Lemberg, K.M.; Lamprecht, M.R.; Skouta, R.; Zaitsev, E.M.; Gleason, C.E.; Patel, D.N.; Bauer, A.J.; Cantley, A.M.; Yang, W.S.; et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* **2012**, *149*, 1060–1072. [\[CrossRef\]](#)
55. Chen, X.; Comish, P.B.; Tang, D.; Kang, R. Characteristics and Biomarkers of Ferroptosis. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 637162. [\[CrossRef\]](#)
56. Bao, W.-D.; Pang, P.; Zhou, X.T.; Hu, F.; Xiong, W.; Chen, K.; Wang, J.; Wang, F.; Xie, D.; Hu, Y.Z.; et al. Loss of ferroportin induces memory impairment by promoting ferroptosis in Alzheimer's disease. *Cell Death Differ.* **2021**, *28*, 1548–1562. [\[CrossRef\]](#)
57. Li, J.; Liu, J.; Xu, Y.; Wu, R.; Chen, X.; Song, X.; Zeh, H.; Kang, R.; Klionsky, D.J.; Wang, X.; et al. Tumor heterogeneity in autophagy-dependent ferroptosis. *Autophagy* **2021**, *17*, 3361–3374. [\[CrossRef\]](#)
58. Tuo, Q.Z.; Lei, P.; Jackman, K.A.; Li, X.L.; Xiong, H.; Li, X.L.; Liuyang, Z.Y.; Roisman, L.; Zhang, S.T.; Ayton, S.; et al. Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke. *Mol. Psychiatry* **2017**, *22*, 1520–1530. [\[CrossRef\]](#)
59. Brown, C.W.; Amante, J.J.; Chhoy, P.; Elaimy, A.L.; Liu, H.; Zhu, L.J.; Baer, C.E.; Dixon, S.J.; Mercurio, A.M. Prominin2 Drives Ferroptosis Resistance by Stimulating Iron Export. *Dev. Cell* **2019**, *51*, 575–586.e4. [\[CrossRef\]](#)
60. Baxter, P.S.; Bell, K.F.; Hasel, P.; Kaindl, A.M.; Fricker, M.; Thomson, D.; Cregan, S.P.; Gillingwater, T.H.; Hardingham, G.E. Synaptic NMDA receptor activity is coupled to the transcriptional control of the glutathione system. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6761. [\[CrossRef\]](#)
61. Deighton, R.F.; Márkus, N.M.; Al-Mubarak, B.; Bell, K.F.; Papadia, S.; Meakin, P.J.; Chowdhry, S.; Hayes, J.D.; Hardingham, G.E. Nrf2 target genes can be controlled by neuronal activity in the absence of Nrf2 and astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E1818–E1820. [\[CrossRef\]](#)
62. Lewerenz, J.; Baxter, P.; Kassubek, R.; Albrecht, P.; Van Liefvering, J.; Westhoff, M.A.; Halatsch, M.E.; Karpel-Massler, G.; Meakin, P.J.; Hayes, J.D.; et al. Phosphoinositide 3-kinases upregulate system xc(-) via eukaryotic initiation factor 2alpha and activating transcription factor 4—A pathway active in glioblastomas and epilepsy. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 2907–2922. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Léveillé, F.; Papadia, S.; Fricker, M.; Bell, K.F.; Soriano, F.X.; Martel, M.A.; Puddifoot, C.; Habel, M.; Wyllie, D.J.; Ikonomidou, C.; et al. Suppression of the Intrinsic Apoptosis Pathway by Synaptic Activity. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 2623–2635. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Papadia, S.; Soriano, F.X.; Léveillé, F.; Martel, M.A.; Dakin, K.A.; Hansen, H.H.; Kaindl, A.; Siffringer, M.; Fowler, J.; Stefovsk, V.; et al. Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 476–487. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Papadia, S.; Stevenson, P.; Hardingham, N.R.; Bading, H.; Hardingham, G.E. Nuclear Ca²⁺ and the cAMP Response Element-Binding Protein Family Mediate a Late Phase of Activity-Dependent Neuroprotection. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 4279–4287. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Soriano, F.X.; Papadia, S.; Hofmann, F.; Hardingham, N.R.; Bading, H.; Hardingham, G.E. Preconditioning Doses of NMDA Promote Neuroprotection by Enhancing Neuronal Excitability. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 4509–4518. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Redmond, L.; Kashani, A.; Ghosh, A. Calcium Regulation of Dendritic Growth via CaM Kinase IV and CREB-Mediated Transcription. *Neuron* **2002**, *34*, 999–1010. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Zhang, T.; Sun, L.; Hao, Y.; Suo, C.; Shen, S.; Wei, H.; Ma, W.; Zhang, P.; Wang, T.; Gu, X.; et al. ENO1 suppresses cancer cell ferroptosis by degrading the mRNA of iron regulatory protein 1. *Nat. Cancer* **2022**, *3*, 75–89. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Martorell-Riera, A.; Segarra-Mondejar, M.; Reina, M.; Martínez-Estrada, O.M.; Soriano, F.X. Mitochondrial fragmentation in excitotoxicity requires ROCK activation. *Cell Cycle* **2015**, *14*, 1365–1369. [\[CrossRef\]](#)
70. Zhang, S.J.; Steijaert, M.N.; Lau, D.; Schütz, G.; Delucinge-Vivier, C.; Descombes, P.; Bading, H. Decoding NMDA receptor signaling: Identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron* **2007**, *53*, 549–562. [\[CrossRef\]](#)
71. Will, Y.; Hynes, J.; Ogurtsov, V.I.; Papkovsky, D.B. Analysis of mitochondrial function using phosphorescent oxygen-sensitive probes. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2563–2572. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Schneider, C.A.; Rasband, W.; Eliceiri, K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

