



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Estudio de la regulación del metabolismo de la glucosa por la actividad sináptica

Marc Segarra Mondéjar



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

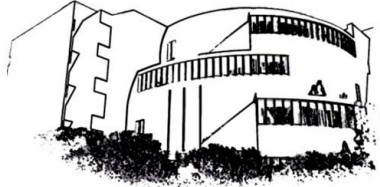
**Estudio de la regulación del metabolismo de
la glucosa por la actividad sináptica.**

Marc Segarra Mondéjar

Barcelona, octubre 2019



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Facultat de Biologia

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Programa de Doctorado en Biomedina

Memoria presentada por Marc Segarra Mondéjar, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona, por el Programa de Doctorado en Biomedina (2015-2019).

La presente tesis doctoral titulada *Estudio de la regulación del metabolismo de la glucosa por la actividad sináptica* ha sido realizada en el grupo de investigación Celltec-UB del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona bajo la dirección del Dr Francesc X. Soriano Zaragoza y el Dr. Manuel Reina del Pozo y tutorizada por el Dr. Manuel Reina del Pozo.

El director,

El co-director y tutor,

El doctorando,

Francesc X. Soriano

Manuel Reina

Marc Segarra

1. AGRADECIMIENTOS



Becas Predoctorales en Neurociencia

La presente tesis ha sido posible gracias a la Beca predoctoral en Neurociencias concedida por la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno en el año 2015.

Hace cinco años ansiaba este momento. Hace cuatro, lo veía lejos. Hace tres, lo veía negro, pero tenía la esperanza de que llegaría. Hace dos, perdí la esperanza. Hace un año, tenía la certeza absoluta, con un valor p inferior a 0,001, de que nunca llegaría. Pero ha llegado. Cuando empecé todo el mundo afirmaba que una tesis doctoral me cambiaría, no solo a nivel científico, sino también a nivel personal. Casi como comer quinoa o hacer pilates. Nada más lejos de la realidad. Podría comparar la tesis con *El mago de Oz*. Tras un largo viaje por un camino de baldosas amarillas y haber hecho grandes amigos, he conseguido llegar a mi destino. Pero demasiado optimista. Puede que mejor con *Doce hombres sin piedad*. Aunque los revisores de revistas científicas suelen ser tres, y son más difíciles de convencer que cualquier jurado americano. Pero sin duda alguna me quedaría con la obra maestra de Francis Ford Coppola: *Appocalypse Now*. Un descenso hacia la locura con el único objetivo de encontrar a mi coronel Kurtz. Aunque creo que es la primera vez que alguien se refiere a HIF-1 α con este nombre.

Como en el caso del capitán Willard, no he hecho este viaje solo. Son muchos los que me han acompañado, sin los cuales, esto no habría sido posible. Aunque creo que nunca podré devolverles su inestimable ayuda creo que al menos puedo reconocerla.

La primera persona sin la cual esto no habría sido posible es mi director de tesis, el Dr. Francesc X. Soriano. No solo fue la primera persona en hablarme de NMDA, Mfn2 y HIF-1 α , también fue la primera en hablarme de *The Wire*. Y no sé que me ha marcado más, si el metabolismo neuronal o es detective James McNulty. Quiero agradecerle toda la confianza que depositó en mí, pero sobre todo su paciencia.

La siguiente persona, es mi co-director y tutor, el Dr. Manuel Reina. Creo que sus clases de Cultivos celulares fueron lo que me inspiraron para llevar a cabo mi TFG en CELLTEC-UB. Espero que algún día escriba un libro con todas sus anécdotas en un laboratorio. Gracias por toda la ayuda y la paciencia. Ha firmado casi cualquier papel que le he dado, prácticamente sin preguntar.

Todo proyecto necesita un capital. En mi caso, he tenido el gran placer de haber contado con una de las becas de neurociencia de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno. Estoy muy agradecido a la Fundación, no solo por la ayuda económica, sino también por su amabilidad. Cualquier trámite o duda presentado a la Fundación ha sido resuelto con gran facilidad y presteza. Las diferentes jornadas organizadas por la Fundación me han permitido conocer a un gran número de jóvenes investigadores como yo con quienes intercambiar ideas y conocimientos. Cuando alguien me pregunta sobre becas de doctorado no dudo en recomendarles las ayudas dadas por la Fundación. Muchas gracias.

Durante mi estancia en el laboratorio he podido trabajar junto a un gran número de compañeros que más tarde se han convertido en amigos. Tengo que agradecer especialmente al Dr. Álex

Martorell por su gran ayuda durante mi primer año en el laboratorio. Aunque su pasión son las mitocondrias fue un placer hablar con él de Roma y los Total war. Y también a Sergi Casellas, Ha sido una gran ayuda, creo que sin sus infalibles dotes para el Western blot esta tesis nunca habría llegado a buen puerto. Pero, sobre todo, un gran compañero de cancaneo. Por supuesto no me olvido de Claudia, María, Xavi, Núria, Víctor, Janat, Sònia, Alejo, Marina, Rubén, Raquel, Adri, Ana, Asarí, Paula y Guillem. Muchas gracias a todos. Ha sido un placer compartir ideas, pero también frustraciones. Creo que hay algo de cada uno de vosotros en esta tesis doctoral. Estoy también muy agradecido al resto de investigadores sénior del laboratorio: Conxita, Ofelia y Enric. Gracias por vuestras anécdotas y consejos.

Gracias a todos mis amigos, tanto a la colleta de Castelló como a los del Xip xop. Me ha encantado saber que no importa el tema (cáncer o genómica) o la disciplina (ciencias del deporte o química), los doctorandos siempre estamos rodeados de un halo de frustración. Aunque siempre hay personas dispuestas a escuchar tus problemas e invitarte a una cerveza.

Muchas gracias a mis padres, Irene y Felipe. Sin vosotros no estaría donde estoy. No solo me habéis pagado la carrera en Barcelona, también os habéis cuidado de mí, y esto tiene mucho mérito, tengo tendencia a romperme huesos, a perderme e incluso a meter la cabeza en paragüeros. Creo que nunca podré devolveros todo lo que me habéis dado.

Por último, muchas gracias a ti, Delia. Has estado ahí siempre que te he necesitado. Me has ayudado en todo lo que te he pedido. Incluso cuando creías que algo no era totalmente ético. Gracias por soportar mis dramas doctorales y mis crisis existencialistas. ¡Gracias! T'estime.

2. RESUMEN

Synaptic activity regulates a long list of essential processes for neuronal development and survival through cytoplasmic Ca²⁺ changes. It modulates several processes that range from the morphology of dendritic trees to neuronal plasticity or mechanisms of defence against oxidative damage. Ca²⁺ entrance through synaptic receptors promotes different changes at cellular level, including cytoskeleton remodelling or stimulation of several signalling pathways that eventually activate different transcriptional factors with a role in the regulation of different transcriptional programs.

During the first weeks after birth occurs the period of the nervous system development in which takes place the highest dendritic and axonal growth ratio. Neuronal growth must be accompanied by the synthesis of new lipids, which are necessary for the formation of new membranes. Although the mechanisms involved in the regulation of dendrites and axons growth have been widely studied, there is very little known about the changes at the metabolic level involved in the synthesis of the biomolecules necessary to supply the formation of new membranes.

The main goal of this doctoral thesis has been studying the mechanism by which synaptic activity regulates neuronal metabolism to promote the synthesis of different precursor metabolites involved in the synthesis of lipids required for neuritic growth. The main model used in this study has been primary cultures of cortical neurons from rat embryos. Synaptic activity has been stimulated by a protocol based on the disinhibition of the neuronal network, consisting in a combined treatment with Bicuculin and 4-aminopyridine.

The results of this thesis show that synaptic activity stimulates glucose uptake and metabolism by increasing the transcription of the main glucose transporter in neurons (Glut3) and different enzymes involved in glycolysis (HK2, PKM1/2 and PFKFB3). The whole process is regulated by a mechanism characterized by the activation of two transcription factors: CREB and HIF-1 α . The activation of CREB, one of the main transcription factors regulated by synaptic activity, promotes the expression of Glut3 and the ubiquitin-protein ligase, Siah2. The activity of the latter is necessary to promote the stabilization and, consequently, the activation of HIF-1 α , which finally promotes the expression of enzymes involved in glycolysis. Glycolysis inhibition or blocking of HIF-1 α activity are sufficient to inhibit stimulation of neuronal growth by synaptic activity. According to these results in cell cultures, the inhibition of this pathway or the elimination of this transcription factor during the first weeks of postnatal development in rodents results in a reduction in the complexity of the dendritic tree.

As shown in this thesis, synaptic activity may also be involved in the regulation of different organelles such as peroxisomes and mitochondria. In the first case, it has been observed that synaptic activity promotes the synthesis of different agents involved in the development and

maintenance of peroxisomes (Pex5, Pex11b and Pex13) and in peroxisomal lipid metabolism (ABCD2 and ACOT8). In regard to mitochondria, it has been proven that synaptically active stimulated neurons show an increase in mitochondrial anterograde transport along the axon active neurons exhibit an increase in mitochondrial anterograde transport along the axon which requires HIF-1 α activity.

3. ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. AGRADECIMIENTOS	5
2. RESUMEN	11
3. ÍNDICE	15
4. ABREVIATURAS	21
5. INTRODUCCIÓN	27
5.1 El crecimiento axonal y dendrítico durante el desarrollo del sistema nervioso central.	29
5.1.1 Desarrollo embrionario del CNS.	29
5.1.2 Neurogénesis y migración.	30
5.1.3 Sinaptogénesis.	31
5.1.4 Crecimiento dendrítico y axonal.	32
5.1.5 La actividad sináptica en la regulación del crecimiento: CREB.	35
5.1.6 Cambios metabólicos durante el desarrollo del sistema nervioso.	37
5.2 El metabolismo de la glucosa en el sistema nervioso.	41
5.2.1 Transporte de la glucosa en el sistema nervioso.	41
5.2.2 La glucosa en la célula.	45
5.2.3 El metabolismo glicolítico y oxidativo en el sistema nervioso.	52
5.2.4 La regulación del metabolismo de la glucosa por HIF-1 α .	54
5.2.5 La glucosa y las patologías del sistema nervioso.	57
5.3 El transporte mitocondrial en el axón.	58
5.4 Los peroxisomas en el sistema nervioso.	61
6. MATERIALES Y MÉTODOS	65
6.1 Reactivos, kits y equipos.	67
6.2 Modelos animales.	75
6.2.1 Ratas.	75
6.2.2 Ratones.	75
6.2.3 Genotipado.	76
6.3 Cultivos primarios de neuronas corticales de embriones de rata.	77
6.3.1 Preparación de medios utilizados.	77
6.3.2 Preparación del <i>coating</i> .	78
6.3.3 Preparación de la solución de disección.	78
6.3.4 Preparación de la solución de papaína.	79
6.3.5 Extracción y disección de las cortezas cerebrales de embriones de rata.	80
6.3.6 Estimulación de la actividad sináptica.	82
6.3.7 Obtención de cultivos de células gliales.	81
6.4 Cultivos de líneas celulares.	82
6.4.1 Línea celular.	83
6.4.2 Manipulación.	83
6.5 Análisis de la expresión génica.	84
6.5.1 Aislamiento de RNA a partir de tejido.	85
6.5.2 Aislamiento del RNA de cultivos neuronales.	85

6.5.3 Síntesis de cDNA.	86
6.5.4 Reacción de qPCR.	87
6.6 Técnicas generales de manipulación del DNA.	88
6.6.1 Transformación de bacterias competentes.	88
6.6.2 Recuperación de DNA plasmídico.	89
6.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa.	89
6.6.4 Electroforesis en gel de agarosa.	90
6.6.5 Clonación.	91
6.6.6 Análisis del DNA por restricción.	94
6.6.7 Secuenciación.	94
6.7 Transfección celular transitoria.	95
6.8 Análisis de la actividad transcripcional.	96
6.9 Medida de los niveles de acetil-CoA y CoA.	97
6.10 Análisis de la incorporación de glucosa y glutamina en lípidos.	98
6.11 Infección con virus adeno-asociados (AAVs).	98
6.11.1 Amplificación de AAVs.	98
6.11.2 Purificación de AAVs.	100
6.11.3 Protocolo de infección.	101
6.12 Cuantificación de proteínas.	101
6.13 Western blot.	101
6.13.1 Extracción de proteína de tejidos.	102
6.13.2 Preparación de la muestra.	102
6.13.3 Electroforesis SDS-PAGE.	103
6.13.4 Transferencia de proteínas.	105
6.13.5 Ensayo de inmunodetección.	106
6.13.6 Densitometría.	107
6.14 Medida de los niveles de ATP.	109
6.15 Medida de los niveles de lactato en el medio.	109
6.16 Inmunofluorescencia.	110
6.17 Técnicas histológicas.	111
6.17.1 Fijación.	112
6.17.2 Realización de cortes histológicos.	114
6.17.3 Inmunohistoquímica.	114
6.17.4 Tinción de Golgi.	117
6.18 Análisis de viabilidad.	119
6.19 Microscopía.	119
6.19.1 Microscopía de campo claro.	119
6.19.2 Microscopía de fluorescencia y confocal.	120
6.20 Análisis estadístico.	125
7. OBJETIVOS	127
8. RESULTADOS	131

8.1 La actividad sináptica depende del metabolismo de la glucosa para promover el crecimiento neurítico.	133
8.1.1 La actividad sináptica estimula la expresión de enzimas implicadas en la síntesis de lípidos.	133
8.1.2 La actividad sináptica promueve la incorporación de glucosa en lípidos.	133
8.1.3 La actividad sináptica incrementa la síntesis de acetil-CoA a partir de la glucosa.	135
8.1.4 La glucosa es necesaria para el crecimiento axonal.	136
8.2 La actividad sináptica estimula tanto la captación como el metabolismo de la glucosa a nivel transcripcional.	138
8.2.1 La actividad sináptica promueve la captación de glucosa por las neuronas.	138
8.2.2 La actividad sináptica estimula el flujo glucolítico en las neuronas.	140
8.2.3 La actividad sináptica estimula la expresión de genes implicados en el transporte y el metabolismo de la glucosa.	142
8.2.4 El factor de crecimiento BDNF también estimula la actividad glicolítica a nivel transcripcional.	145
8.2.5 La activación del metabolismo de la glucosa tiene lugar en las neuronas estimuladas.	146
8.3 La actividad sináptica estimula la glucólisis mediante la estabilización de HIF-1α.	148
8.3.1 La actividad sináptica estabiliza HIF-1 α en normoxia.	148
8.3.2 HIF-1 α es necesario para activar el metabolismo de la glucosa en las neuronas estimuladas sinápticamente.	150
8.3.3 La actividad sináptica estimula la transcripción de PDK1 y PDK3 mediante la activación de HIF-1 α .	153
8.4 LA ACTIVIDAD DE SIAH2 Y LDH ESTABILIZA HIF-1α.	154
8.4.1 La actividad sináptica reduce la actividad de las enzimas PHDs.	154
8.4.2 La actividad sináptica estimula la síntesis de Siah2 a nivel transcripcional:	155
8.4.3 La actividad sináptica estabiliza HIF-1 α a partir de un mecanismo que depende de Siah2.	157
8.5 CREB regula la expresión de Glut3 y Siah2.	160
8.5.1 La activación de la transcripción de Glut3 por la estimulación sináptica depende de CREB.	160
8.5.2 La activación de la transcripción de Siah2 por la estimulación sináptica depende de CREB.	161
8.6 La glucólisis es necesaria para el correcto desarrollo del crecimiento neurítico.	166
8.6.1 HIF-1 α y Siah2 juegan un papel clave en la estimulación del crecimiento neurítico.	166
8.6.2 La glucólisis es necesaria para el correcto crecimiento del árbol dendrítico durante el desarrollo postnatal.	168
8.6.3 HIF-1 α juega un papel clave en el crecimiento del árbol dendrítico durante el desarrollo postnatal.	169
8.7 Regulación del factor de crecimiento igf1 por la actividad sináptica.	172
8.8 La actividad sináptica y el transporte de mitocondrias en el axón.	174
8.8.1 La actividad sináptica estimula el transporte mitocondrial anterógrado.	174
8.8.2 La actividad sináptica estimula la expresión de MGARP mediante un mecanismo independiente de HIF-1 α .	175
8.9 La actividad sináptica y los peroxisomas.	176
8.9.1 La actividad sináptica regula la expresión de genes implicados el desarrollo y el metabolismo de los peroxisomas.	176
9. DISCUSIÓN	179

9.1	La actividad sináptica estimula el metabolismo glucolítico con el objetivo de sintetizar los lípidos utilizados en la síntesis de las nuevas membranas destinadas al crecimiento neurítico.	182
9.2	La activación del metabolismo de la glucosa tiene lugar en las neuronas estimuladas.	190
9.3	La actividad sináptica estimula la expresión de IGF1 mediante el factor de transcripción CREB.	191
9.4	La actividad sináptica y el transporte mitocondrial en el axón.	193
9.5	La actividad sináptica y los peroxisomas.	194
10.	CONCLUSIONES	197
11.	BIBLIOGRAFÍA	201
12.	ANEXO: PUBLICACIONES	243

4. ABREVIATURAS

[3H]-2-DG: [3H]-2-deoxiglucosa
 2-DG: 2-deoxiglucosa
 2-NBDG: 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxiglucosa
 2-OG: 2-oxglutarato
 4-AP: 4-Aminopiridina
 ACC: acetil-CoA carboxilasa
 ACLY: ATP-citrato liasa
 ACP: proteína transportadora de acilo
 AGPAT: 1-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferasa
 ALT: alanina transaminasa
 AMP: adenosín monofosfato
 ANLS: lanzadera de lactato astrocito-neurona
 APS: persulfato amónico
 APV: ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico
 AraC: Arabinósido de citosina
 ATP: trifosfato de adenosina
 BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro
 bHLH-PAS: dominio estructural hélice-bucle-hélice-básico-PER-ARNT-SIM
 Bic: Bicucullina
 BSA: albúmina sérica bovina
 CaMKs: proteínas quinasas dependiente de calcio/calmodulina
 CBP: proteína de unión a CREB
 CCCP: Carbonil cianida 3-clorofenilhidrazona
 CHX: cicloheximida
 CMRglc: índice metabólico cerebral de la glucosa
 CMRO2: índice metabólico cerebral de oxígeno
 CNS: Sistema Nervioso Central
 CoA: coenzima A
 CRE: elemento de respuesta a AMP cíclico
 CREB: proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico
 DAB: 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorido hidrato
 DAG: diacilglicéridos
 DGAT: diacilglicerol aciltransferasa
 DHA: ácido docosahexaeónico
 DHAP: dihidroxiacetona fosfato
 DIV: días in vitro
 DLAT: dihidrolipoil transacetilasa
 DLD: dihidrolipoil deshidrogenasa
 DM: Medio de disociación
 DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
 DMSO: dimetil sulfóxido
 DNA: Ácido desoxirribonucleico
 E3BP: proteína de unión a E3
 ERK1/2: quinasa regulada por señales extracelulares 1/2
 FADH2: flavín adenín dinucleótido
 FADS2: $\Delta 6$ desaturasa
 FASN: ácido graso sintasa
 FBS: Suero Fetal Bovino
 FSK: Forskolina
 G6PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
 GFAT: L-glutamina D-fructosa-6-fosfatoamidotransferasa
 Glc-6-P: glucosa-6-fosfato
 GLS: glutaminasa
 GLUT: transportador de glucosa
 GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferasa

GPD1: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
 GS: glicógeno sintasa
 GSH: glutatión
 GSSG: forma oxidada
 GTP: guanosín trifosfato
 HAT: histona acetiltransferasa
 HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution
 HEK293: células de riñon embrionario humano 293
 HIF-1 α : factor inducible por hipoxia-1 α
 HK: Hexokinasa
 HRE: elemento de respuesta a hipoxia
 IDH1: isoforma 1 de la isocitrato deshidrogenasa
 IGF1: factor de crecimiento similar a la insulina
 IGF1R: receptor de IGF1
 ITS: Solución Insulina-Transferrina-Selenio-Etanolamina
 K: Acido quinurénico
 KD: Knock Down
 KO: knockout
 LDH: lactato deshidrogenasa
 L-Gln: L-Glutamina
 MCT: transportador de monocarboxilatos
 MCU: uniportador mitocondrial de calcio
 MEM: Minimum Essential Medium
 MGARP: proteína rica en ácido glutámico localizada en la mitocondria
 mRNA: RNA mensajero
 MSK: quinasa activada por mitógenos y estrés (
 mTORC1: diana de rapamicina en células de mamífero
 NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
 NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
 NBA: Neurobasal A Medium
 NF κ B: factor nuclear kappa B
 NMDA: N-metilo D-aspartato
 NT-3: neurotrofina-3
 NVU: unidad neurovascular
 ODDD: dominio de degradación dependiente de oxígeno
 OGI: índice oxígeno-glucosa
 OGT: O-GlcNAc transferasa
 OMM: membrana externa de la mitocondria
 Oxam: oxamato de sodio
 P/E: Penicilina/Estreptomina
 PAP: fosfatasa del ácido fosfatídico
 PB: Tampón fosfato
 PBS: Tampón fosfato salino
 PC: piruvato carboxilasa
 PDH: piruvato deshidrogenasa
 PDK: piruvato deshidrogenasa quinasa
 PDP: piruvato deshidrogenasa fosfatasa
 PEP: fosfoenolpiruvato
 PET: tomografía de emisión de positrones
 PET: tomografía de positrones
 PFA: paraformaldehido
 PFK1: fosfofructoquinasa-1
 PFKFB: 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa
 PHD: enzimas prolil hidroxilasas
 PK: piruvato quinasa

PKA: proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
PL: Hidrobromuro de Poli-D-Lisina
Plk3: quinasa similar a Polo 3
PPAR- γ : receptor gamma activador de la proliferación de peroxisomas
PPP: vía de las pentosas fosfato
PUFA: ácidos grasos poliinsaturados
PVDF: difluoruro de poli-vinileno
Pyr: Piruvato sódico
RG: Glía Radial
RNA: Ácido Ribonucleico
RPE: ribulosa-5-fosfato epimerasa
RPI: ribosa-5-fosfato isomerasa
S6K: quinasa S6 ribosomal
SGLT: cotransportadores dependientes de sodio
SLC2: solute carrier family 2
SREBP: proteína de unión al elemento regulador de esteroles
TAD: dominio de transactivación
TAE: Tampón Tris-Acetato-EDTA
TAG: triacilglicéridos
TAL: transaldolasa
TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TKL: transcetolasa
TMITS: Medio de transfección
TMO: Medio bajo soporte trófico
Tmx: tamoxifeno
TROLOX: ácido (\pm)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
TSC: complejo esclerosis tuberosa
UDP-GlcNAc: 5-difosfato-N-acetilglucosamina
VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje
VGCC: canales activados por voltaje
VHL: complejo ubiquitina ligasa von Hippel-Lindau
VZ: Zona Ventricular

5. INTRODUCCIÓN

5.1 El crecimiento axonal y dendrítico durante el desarrollo del sistema nervioso central.

El sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés) humano es sin duda el tejido biológico más complejo. Está formado por alrededor de 9 billones de neuronas, junto con número prácticamente equivalente de células gliales, que se distribuyen entre el encéfalo y la médula espinal. Dada su elevada complejidad el CNS humano tarda prácticamente dos décadas en desarrollarse por completo (Silbereis *et al.*, 2016).

5.1.1 Desarrollo embrionario del CNS.

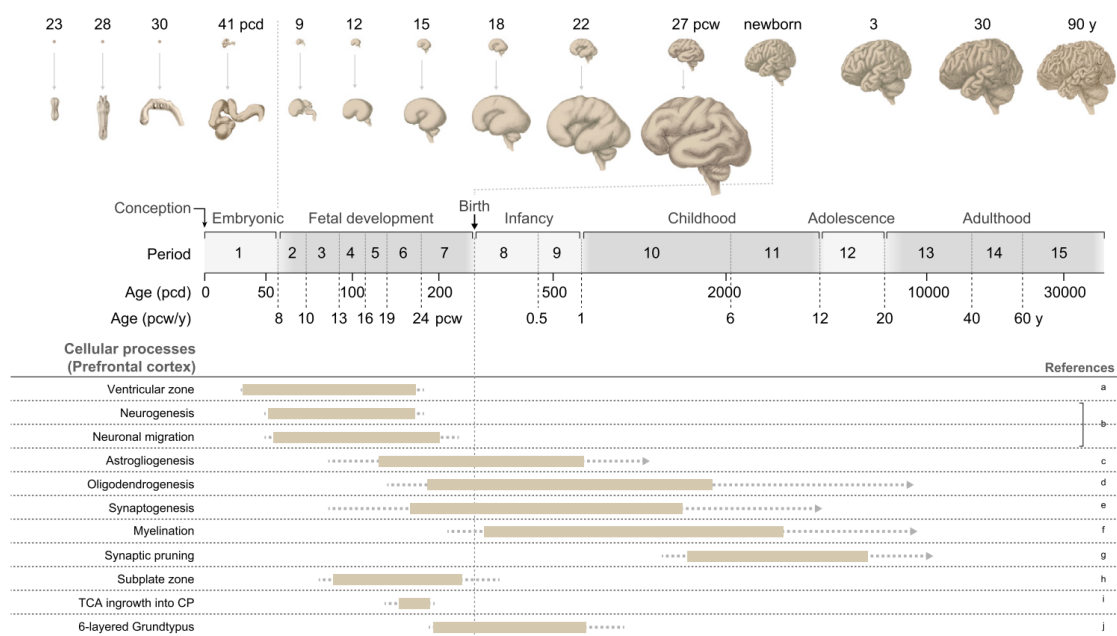


Figura 1: Línea temporal de los diferentes procesos clave durante el desarrollo del CNS. En la parte superior se muestra las ilustraciones con los cambios anatómicos que experimenta durante el desarrollo el CNS. La segunda parte muestra el momento durante el desarrollo en que ocurren diferentes procesos. La línea temporal indica el periodo en el desarrollo y la edad en días tras la concepción (pcd). Adaptado (Silbereis *et al.*, 2016).

El CNS es uno de los primeros órganos que empiezan su desarrollo tras la concepción y uno de los últimos en completarlo tras el nacimiento. El desarrollo del CNS se extiende desde los primeros estadios del desarrollo hasta prácticamente el inicio de la edad adulta (Figura 1). Mientras que en ratones y ratas empieza a partir del estadio E10.5-11 y E9-9.5, respectivamente, en humanos empieza durante la tercera semana de desarrollo (Semple *et al.*, 2013; Silbereis *et al.*, 2016).

El desarrollo del sistema nervioso empieza con la formación de la placa neural a partir del ectodermo, una de las tres capas germinales, inmediatamente tras la formación del notocordio. A partir de la generación de dos plegamientos a ambos lados de la línea media de la placa neural tiene lugar la formación del denominado surco neural, que se convertirá en el tubo neural tras la fusión de ambos plegamientos. El proceso de fusión empieza en el centro de la placa neural y a continuación se extiende tanto en sentido caudal como rostral. Acaba cuando las oberturas, o neuroporos, en los extremos caudal y rostral se cierran para separar el sistema ventricular del líquido amniótico. En humanos este proceso termina alrededor de los 29-30 días de gestación (Silbereis *et al.*, 2016).

A lo largo del eje rostro-caudal el tubo neural queda segmentado en diferentes regiones que en el futuro darán lugar a las tres vesículas principales del encéfalo: prosencefalo (cerebro anterior), mesencéfalo (cerebro medio) y *rombencéfalo* (cerebro posterior). Mientras que la región caudal dará lugar a la médula espinal (Silbereis *et al.*, 2016). Los diferentes segmentos empezarán entonces el proceso de organización que finalmente determinará las futuras regiones en que se subdivide el CNS (Stiles and Jernigan, 2010). Este proceso depende de los niveles de expresión de diferentes factores de transcripción, como por ejemplo *Emx2* y *Pax6*, que determinan la localización de las áreas sensorimotoras en la corteza cerebral (Bishop, Rubenstein and O'Leary, 2002).

5.1.2 Neurogénesis y migración.

Tras la formación y segmentación del tubo neural, empieza el proceso de generación de nuevas neuronas conocido como neurogénesis. La pared del tubo neural contiene inicialmente una capa pseudoestratificada de células neuroepiteliales conocida como zona ventricular (VZ). Esta población celular dará lugar a las células progenitoras neurales. Inicialmente, entre los 25 y los 42 días de gestación, empezarán a dividirse rápidamente de forma simétrica con el objetivo de incrementar el tamaño de esta población de cara a la generación de nuevas neuronas. Durante la división simétrica, a partir de un progenitor neuronal se generan dos idénticos. Al principio de la neurogénesis las células neuroepiteliales darán lugar a la glia radial (RG, por sus siglas en inglés). Estas células progenitoras, localizadas en la VZ se dividirán tanto simétrica como asimétricamente. En el segundo caso dando lugar a otra RG y a una neurona o a una célula progenitora intermedia que por división simétrica dará lugar a dos nuevas neuronas. Las neuronas nacientes irán migrando radialmente hasta su localización final en la corteza cerebral, para dar lugar, principalmente, a neuronas excitadoras glutamanérgicas. Dentro de la propia corteza cerebral, sin embargo, coexisten neuronas con orígenes diferentes. Las interneuronas GABAérgicas, a diferencia de las glutamanérgicas, son generadas a partir de células progenitoras

en las eminencias ganglionares y migran tangencialmente hasta su localización final en la corteza (Stiles and Jernigan, 2010; Silbereis *et al.*, 2016).

5.1.3 Sinaptogénesis.

Tras alcanzar su localización final empieza el proceso de formación de la red neuronal. Para ello las neuronas deberán empezar a comunicarse entre ellas estableciendo conexiones o sinapsis. Las sinapsis son estructuras de comunicación intercelular especializadas en la transferencia de información en forma de señales químicas o eléctricas entre neuronas. En función del tipo de señales implicadas pueden clasificarse en químicas o eléctricas, siendo las primeras las de mayor relevancia en la transmisión del impulso nervioso de una neurona a otra. Tal como se resume en la Figura 2, en las sinápsis químicas, la llegada un potencial de acción al terminal sináptico del axón de la neurona pre-sináptica, promueve la entrada de Ca^{2+} a través de los canales dependientes de voltaje. Como consecuencia se produce la exocitosis de vesículas cargadas de neurotransmisores a la hendidura sináptica, donde interaccionan con los receptores sinápticos localizados en las espinas sinápticas de las dendritas de la neurona post-sináptica. En función de si los receptores son excitadores o inhibidores tendrá lugar la despolarización o la hiperpolarización de la membrana neuronal, respectivamente (Südhof and Malenka, 2008; Choquet and Triller, 2013).

El proceso de formación de nuevas sinapsis se conoce como sinaptogénesis. Aunque en humanos empieza en los estadios intermedios del desarrollo embrionario (alrededor de las 20 semanas de gestación), la densidad sináptica experimenta su mayor incremento durante los primeros meses tras el nacimiento (Semple *et al.*, 2013). Durante la infancia el número de espinas sinápticas presentes en la corteza prefrontal del cerebro humano es de dos a tres veces mayor que en la edad adulta (Petanjek *et al.*, 2011). Sin embargo, durante las dos primeras décadas de vida el número de sinapsis se irá reduciendo por el proceso conocido como poda sináptica (Südhof, 2018). No obstante, en función de la clase neuronal, existe una gran variabilidad en relación a los mecanismos que determinen la formación y el desarrollo de nuevas sinapsis (Andreae and Burrone, 2014). En ratones *knockout* (KO) para la subunidad GluR δ 2 de los receptores de glutamato, se observó que, aunque durante la primera semana de desarrollo post-natal el número de sinapsis formadas era el mismo que en el ratón control, el número de sinapsis que finalmente maduraban en el KO era prácticamente la mitad (Kurihara *et al.*, 1997). Sin embargo, en ratones transgénicos que expresaban la toxina tetánica en las neuronas bipolares activadoras de la retina, se observó el efecto contrario, el número de sinapsis formadas se reducía a la mitad pese a que la tasa de eliminación se mantenía constante (Kerschensteiner *et al.*, 2009).

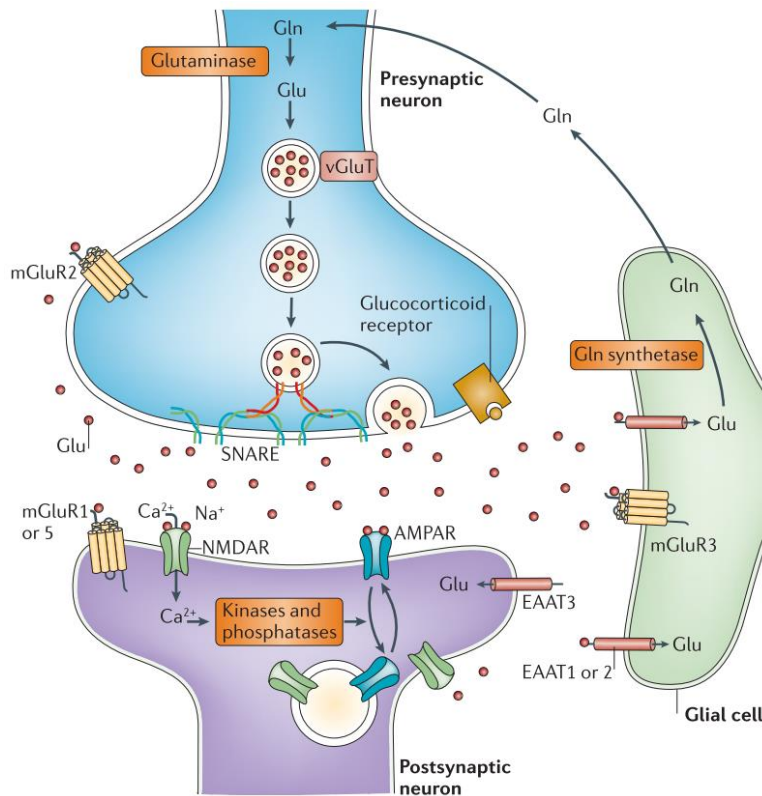


Figura 2: Ejemplo de sinapsis glutaminérgica. El glutamato, almacenado en vesículas, es liberado a la hendidura postsináptica donde interacciona con los receptores ionotrópicos de glutamato (receptores de NMDA y de AMPA) y con los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR1 a mGluR8) localizados en las membranas tanto de las neuronas presinápticas como de las postsinápticas y de las células de la glía. Tras la interacción con el neurotransmisor los receptores inician diferentes respuestas como la entrada de Ca^{2+} o la activación de diferentes cascadas de señalización. Adaptado (Popoli *et al.*, 2012)

5.1.4 Crecimiento dendrítico y axonal.

Antes de formarse las sinapsis las neuronas necesitan desarrollar todo un conjunto de estructuras que les permitan poner en contacto sus membranas: los axones y las dendritas. Aunque ambas estructuras celulares son esenciales para la propagación del impulso nervioso, son totalmente diferentes a nivel de composición, morfología y desarrollo. Los axones son típicamente largos y delgados, con un ancho generalmente uniforme y poco ramificados. Las dendritas, en cambio, son relativamente cortas y a medida que se alejan del soma su anchura disminuye. Además, presentan un mayor nivel de ramificaciones que los axones.

A nivel funcional, a través del axón tiene lugar el transporte del impulso nervioso hasta el terminal sináptico, ubicado en el extremo del mismo. Es en este punto donde se acumulan las vesículas cargadas de neurotransmisores que con la llegada del impulso nervioso serán excitadas a la hendidura sináptica. Sin embargo, las dendritas son las encargadas de transferir esta señal hasta el soma. A lo largo de las dendritas se encuentran las denominadas espinas dendríticas que contienen los receptores sinápticos, encargados de interactuar con los neurotransmisores

liberados a la hendidura sináptica desde el cono axonal (Arimura and Kaibuchi, 2007). Teniendo en cuenta las diferencias a nivel funcional y estructural, no es de extrañar que existan diferencias a nivel del desarrollo de ambas estructuras.

El desarrollo de ambas estructuras empieza durante las primeras fases del desarrollo neuronal. Banker y colaboradores utilizaron cultivos embrionarios de neuronas de hipocampo de rata para describir el proceso inicial de formación de axones y dendritas (Dotti, Sullivan and Banker, 1988). Tras su adhesión a la placa de cultivo, las neuronas empiezan a generar filopodios. Transcurridas unas horas empiezan a formar las primeras neuritas inmaduras. Estas extensiones se alargan y retraen aleatoriamente. Aunque inicialmente todas ellas tienen el mismo tamaño, tras medio día en cultivo una de ellas empieza a crecer a un ritmo mucho mayor que el resto. Esta neurita dará lugar al axón y el resto a las dendritas. Tras una semana en cultivo, las dendritas empezaran a generar las primeras espinas sinápticas. Todo este proceso queda resumido en la Figura 3. Finalmente, las dendritas y axones de las neuronas presentes empezarán a formar sinapsis entre ellas. A partir de este punto, el crecimiento de ambas estructuras vendrá determinado por mecanismos en principio diferentes. Sin embargo, como en el caso de la formación y el mantenimiento de las sinapsis, vendrá regulado por un proceso común: la actividad sináptica.

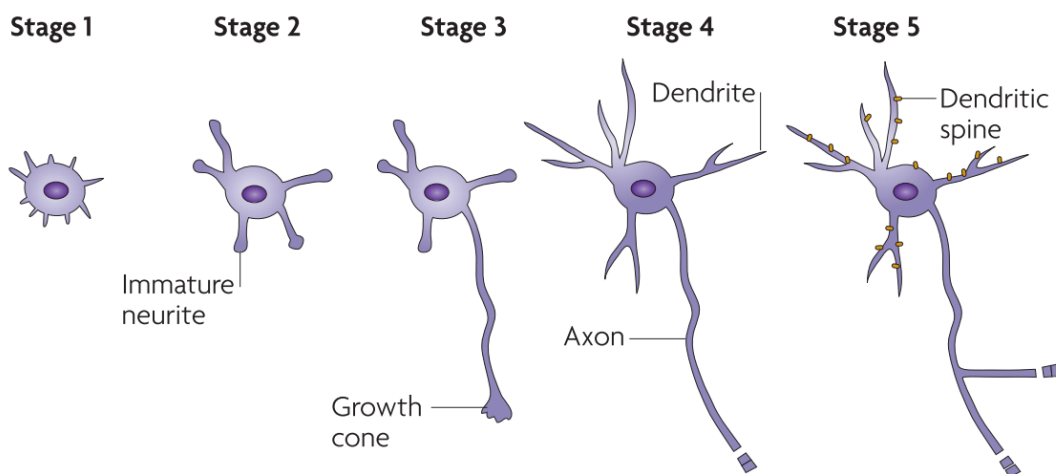


Figura 3: Cambios en la morfología neuronal durante el proceso de polarización neuronal. Representación esquemática del proceso de polarización neuronal en neuronas embrionarias del hipocampo. Tras la unión de las neuronas al sustrato (*Stage1*) empiezan a crecer diferentes neuritas (*Stage2*) hasta que una de las neuritas se desarrolla mucho más que el resto para dar lugar al axón (*Stage3*). El resto de neuritas darán lugar a las dendritas (*Stage4*) donde finalmente se desarrollarán las espinas sinápticas (*Stage5*). Adaptado (Arimura and Kaibuchi, 2007).

5.1.4.1 Crecimiento axonal.

Generalmente, el crecimiento axonal precede al crecimiento dendrítico (McAllister, 2000). Uno de los primeros aspectos a tener en cuenta a la hora de tratar el crecimiento axonal es el proceso de polarización neuronal, es decir, el proceso por el cual una de las neuritas inmaduras incrementa drásticamente su crecimiento para dar lugar al axón. Uno de los factores que regula

tanto la polarización como el crecimiento neuronal es la secreción de neurotrofinas, una familia de factores de crecimiento caracterizados por regular el mantenimiento, el desarrollo y el funcionamiento del sistema nervioso (Huang and Reichardt, 2002). Se ha comprobado que la aplicación local del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) o de la neurotrofina-3 (NT-3) en una determinada neurita de neuronas de hipocampo en cultivo incrementa su crecimiento por encima del resto, determinando su conversión en axón (Cheng *et al.*, 2011; Nakamuta *et al.*, 2011).

Existen otros factores implicados en el crecimiento axonal. Se ha observado que las moléculas de la matriz extracelular, como la laminina, juegan también un papel clave en el crecimiento axonal (Lein, Banker and Higgins, 1992; Rivas, Burmeister and Goldberg, 1992; Tonge *et al.*, 1997). Como en el caso de las neurotrofinas, la laminina fomenta la diferenciación del axón y su desarrollo en cultivo (Lein, Banker and Higgins, 1992).

Otro factor clave, también implicado en el crecimiento axonal, es la actividad sináptica. Como se ha comentado anteriormente, la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores pre-sinápticos puede activar toda una serie de cascadas de señalización. A nivel axonal, se ha comprobado que la actividad sináptica incrementa el reclutamiento del receptor de BDNF, TrkB, a la membrana plasmática (Meyer-Franke *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2000). El incremento en los niveles de este receptor hace que la neurona sea más sensible al BDNF, fomentando de esta forma su crecimiento.

5.1.4.2 Crecimiento dendrítico.

El crecimiento dendrítico se basa tanto en la extensión como en la ramificación de las dendritas. Las dendritas primarias emergen del soma y se ramifican dando lugar a las dendritas secundarias y terciarias. Este proceso sigue diferentes patrones en función de la clase neuronal y queda definido tanto por el mantenimiento y la generación de nuevas prolongaciones como por la eliminación o el acortamiento de las ya existentes. El crecimiento y morfología dendríticos está influenciado por diferentes señales, como las procedentes de la interacción con células vecinas de la misma clase, del contacto con células presinápticas o de la señalización retrógrada proveniente de neuronas postsinápticas (Wong and Ghosh, 2002).

Uno de los mecanismos clave en la regulación del crecimiento dendrítico es la estimulación aferente, es decir, la llevada a cabo por aquellas neuronas que transportan la información desde los órganos sensoriales al CNS. De hecho, durante el desarrollo la fase de sinaptogénesis e innervación aferente coincide con el período de mayor crecimiento dendrítico. En ratas criadas en oscuridad durante las primeras semanas de vida se observó una disminución en la densidad dendrítica de las neuronas estrelladas de la corteza visual (Borges and Berry, 1978). En línea con este resultado se ha comprobado que el enriquecimiento tanto ambiental como social promueve

la ramificación de las neuronas corticales estrelladas de la capa IV (Volkmar and Greenough, 1972).

Por otro lado, la morfología del árbol neuronal también puede ser remodelada por la acción de otros elementos como BDNF. Se ha comprobado que la interacción de este factor de crecimiento con su receptor, TrkB, promueve tanto la ramificación como el crecimiento de las dendritas en diferentes clases neuronales (Arikkath, 2012).

5.1.5 La actividad sináptica en la regulación del crecimiento: CREB.

La actividad sináptica regula toda una larga lista de procesos tanto a nivel funcional como fisiológico en las neuronas mediante la generación de cambios transitorios en los niveles de Ca^{2+} en el citoplasma (Cohen and Greenberg, 2008; Hardingham and Bading, 2010). El bloqueo tanto de la entrada de Ca^{2+} extracelular por los canales activados por voltaje (VGCC, por sus siglas en inglés) como de la liberación de las reservas internas de Ca^{2+} inhibe este efecto (Chevalleyre, Moos and Desarménien, 2002). En células ganglionares de la retina, corroboró que la estimulación sináptica promueve la liberación del Ca^{2+} que promueve la estabilización de las dendritas en desarrollo (Lohmann, Myhr and Wong, 2002).

Los receptores de ionotrópicos de NMDA (N-metilo- D-aspartato), juegan un papel clave en esta regulación. En estudios con *Xenopus* se comprobó que la activación de los receptores glutaminérgicos de NMDA promueve el desarrollo inicial del árbol dendrítico, ya que el tratamiento con APV, antagonista de este receptor, causaba una reducción en el tamaño del árbol dendrítico de las neuronas del tectum de renacuajos (Rajan and Cline, 1998). El papel de los receptores de NMDA en el crecimiento también se ha confirmado en otros organismos y en otras clases neuronales. En roedores se ha comprobado su rol en el crecimiento de neuronas motoras de la médula espinal, neuronas granulares del giro dentado o de neuronas estrelladas de la capa IV de la corteza cerebral (Kalb, 1994; Prithviraj and Inglis, 2008; Espinosa *et al.*, 2009; Mizuno *et al.*, 2014).

La entrada de Ca^{2+} activa toda una serie de cambios que van desde el reclutamiento de nuevos receptores sinápticos hasta la activación de diferentes vías de señalización como por ejemplo la vía de las las proteínas quinasas dependiente de calcio/calmodulina (CaMKs, por sus siglas en inglés) o la de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2, por sus siglas en inglés) (Shi *et al.*, 1999; Hardingham and Bading, 2010). Las diferentes cascadas de señalización iniciadas por la actividad sináptica son capaces de transducir la señal desde los receptores sinápticos hasta el núcleo celular, donde tiene lugar la estimulación de diferentes programas de transcripción. La proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB, por sus siglas en inglés) es un factor de transcripción clave en la regulación de la expresión génica por la

actividad sináptica mediante la interacción con la secuencia conocida como elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE, por sus siglas en inglés) (Cohen and Greenberg, 2008). La activación de CRE se da por la fosforilación del residuo Ser-133. El incremento en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma o en el núcleo activa diferentes quinasas implicadas en la fosforilación de CREB como, por ejemplo, las CaMKs, las quinasas S6 ribosomales (S6K, por sus siglas en inglés) o las quinasas activadas por mitógenos y estrés (MSK, por sus siglas en inglés) (Gonzalez and Montminy, 1989; Dash *et al.*, 1991; Sheng, Thompson and Greenberg, 1991; Cohen and Greenberg, 2008).

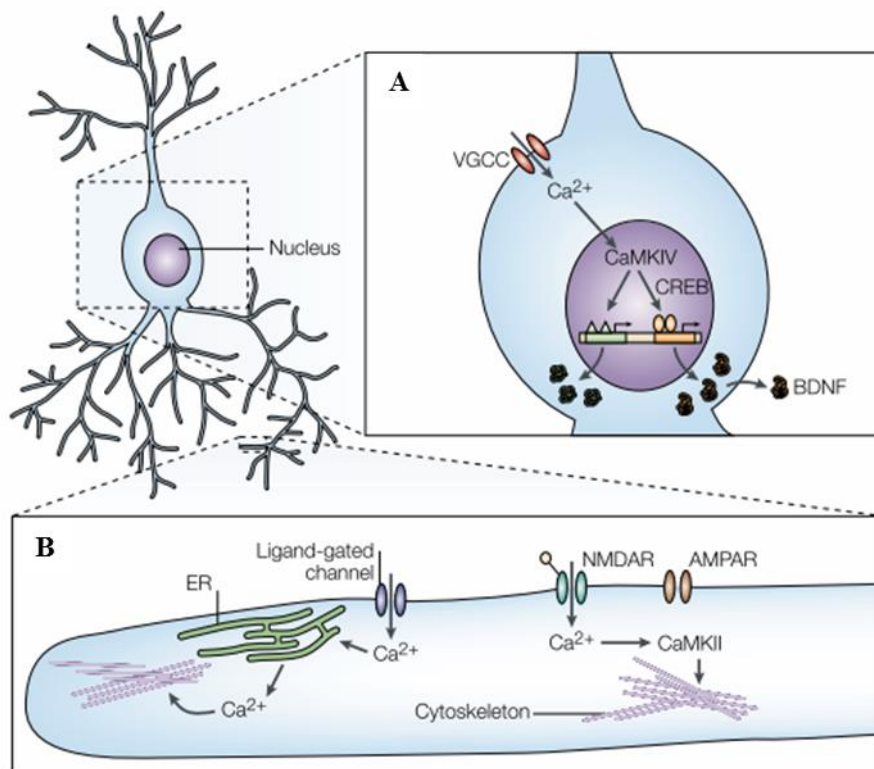


Figura 4: Representación esquemática de los mecanismos dependientes de Ca^{2+} que regulan el crecimiento dendrítico. A) En las neuronas corticales el calcio entra a través de los canales de calcio sensibles a voltaje, activando la quinasa CaMKIV. Esta enzima activa el factor de transcripción CREB, entre otros, lo que regula la expresión de proteínas implicadas en el crecimiento dendrítico como el factor de crecimiento BDNF. B) Vías implicadas en la regulación del crecimiento dendrítico. El incremento en el Ca^{2+} citoplasmático puede ser debido tanto a la entrada a través de diferentes canales iónicos o a su liberación por el retículo endoplasmático. El Ca^{2+} puede regular el citoesqueleto de actina. Adaptada (Wong and Ghosh, 2002).

En su forma inactiva, CREB interacciona con la secuencia CRE y recluta diferentes componentes de la maquinaria de transcripción. Sin embargo, la presencia de diferentes represores y el estado relativamente condensado de la cromatina limitan la expresión génica a niveles basales. Tras su activación, CREB recluta a la proteína de unión a CREB (CBP, por sus siglas en inglés) y a su parólogo p300 que incrementan la actividad transcripcional de CREB (Chrivia *et al.*, 1993; Arias *et al.*, 1994; Kwok *et al.*, 1994). Ambos coactivadores son histona

acetiltransferasas (HAT), capaces de catalizar la acetilación de la mayoría de histonas haciendo la secuencia génica más accesible y promoviendo, por lo tanto, la transcripción (Ogryzko *et al.*, 1996). CBP, por otro lado, también puede promover la transcripción interaccionando y estabilizando diferentes factores implicados en el inicio de la transcripción (Kwok *et al.*, 1994).

CREB juega un papel clave en el desarrollo y la supervivencia neuronal. La delección de CREB en ratones durante el desarrollo causa la muerte por apoptosis de las neuronas durante los estadios finales del desarrollo (Mantamadiotis *et al.*, 2002). La delección en ratones postnatales induce un proceso de neurodegeneración tanto en el hipocampo como en el estriado dorsolateral similar al observado en la enfermedad de Huntington (Mantamadiotis *et al.*, 2002). CREB también ha sido ampliamente relacionado con el proceso de arborización y crecimiento dendrítico en neuronas de la corteza celular y del hipocampo (Wayman *et al.*, 2006; S. Li *et al.*, 2009). En neuronas sensoriales de ratones KO para CREB también se observó una reducción en el crecimiento axonal (Lonze *et al.*, 2002). Redmond y colaboradores demostraron que la entrada de Ca^{2+} a través de los VGCCs promueve la activación de la CaMKIV que fosforila y consecuentemente activa CREB. El bloqueo tanto de la quinasa como del factor de transcripción se traducían en una reducción en el crecimiento de las dendritas en cultivos de neuronas corticales (Redmond, Kashani and Ghosh, 2002). Uno de los posibles mecanismos por los cuales CREB promueve el crecimiento neuronal es mediante la activación de BDNF. BDNF es un factor de crecimiento implicado en la regulación tanto del crecimiento dendrítico como axonal (Schwartz *et al.*, 1997; Wilson Horch *et al.*, 1999; Namekata *et al.*, 2010, 2012; Liao *et al.*, 2015). Como se observa en la Figura 4 la activación de CREB como consecuencia de la entrada de Ca^{2+} induce la transcripción de BDNF y como consecuencia el crecimiento neurítico (Tao *et al.*, 1998; X. Yan *et al.*, 2016; Serita, Fukushima and Kida, 2017).

5.1.6 Cambios metabólicos durante el desarrollo del sistema nervioso.

El crecimiento de dendritas y axones depende tanto de la reorganización del citoesqueleto como de la síntesis de nuevas membranas. Una neurita de $1\mu\text{m}$ de diámetro que crece a un ritmo de $20\text{-}50\mu\text{m/h}$ incrementa su superficie a un ritmo de $60\text{-}150\mu\text{m}^2/\text{h}$ (Futerman and Banker, 1996). Por lo tanto, la célula necesita disponer de los componentes básicos de las membranas: los lípidos. El cerebro es el órgano con una mayor proporción de lípidos. En humanos, el 40% del peso seco de la sustancia gris se corresponde con lípidos mientras que en la sustancia blanca constituyen hasta el 60% debido al elevado contenido de mielina (O'Brien and Sampson, 1965). El cerebro es capaz de sintetizar una gran variedad de lípidos (colesterol, fosfolípidos, esfingolípidos...) *de novo*. No obstante, es incapaz de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés), necesarios para la síntesis de un gran número de lípidos y, en algunos casos, como los

ácidos linoleico y α -linoleico, es incapaz de sintetizar la cantidad necesaria. Por este motivo la mayoría de los ácidos grasos son obtenidos a partir de la dieta (Tracey *et al.*, 2018). Dado que son moléculas anfifílicas, no pueden atravesar directamente la BBB y tienen que ser transportados a partir de tres mecanismos diferentes: mediante receptores, mediante proteínas transportadoras o mediante transporta activo (Weiler *et al.*, 2017). MFSD2a, por ejemplo, es el principal transportador en la BBB del ácido docosahexaéonico (DHA, por sus siglas en inglés), el ácido graso polinsaturado ω 3 más abundante del cerebro (Salem *et al.*, 2001; Ben-Zvi *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2014).

Aunque inicialmente se pensaba que las células gliales eran las encargadas de sintetizar los lípidos utilizados por las neuronas en la formación y mantenimiento de axones, dendritas y sinapsis (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2004; Camargo, Smit and Verheijen, 2009; Nieweg, Schaller and Pfrieder, 2009; van Deijk *et al.*, 2017), se ha comprobado que las neuronas pueden sintetizar determinados lípidos, como por ejemplo DHA (Kaduce *et al.*, 2008; Simón *et al.*, 2016). También se ha comprobado que tanto las neuronas adultas como los progenitores neuronales expresan los genes implicados en la síntesis de ácidos grasos. En *Drosophila melanogaster* el *Knock Down* (KD) de los genes acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa 1 (FASN1, por sus siglas en inglés) en neuronas nociceptivas de clase IV disminuye el nivel de crecimiento dendrítico (Ziegler *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha descrito que FASN juega un papel clave en la proliferación de las células madre adultas de ratón (Knobloch *et al.*, 2013).

Los ácidos grasos son esenciales para la síntesis de los fosfolípidos, los componentes básicos de las membranas celulares. Su síntesis tiene lugar en el citoplasma de las células de tejidos lipogénicos. Como se resume en la Figura 5, el primer paso, es la carboxilación del acetil-CoA para dar lugar a malonil-CoA. Esta reacción, catalizada por la ACC, es irreversible y representa uno de los pasos limitantes en la síntesis de ácidos grasos (Tracey *et al.*, 2018). A continuación, una molécula de acetil-CoA y otra de malonil-CoA interaccionan con el dominio proteína transportadora de acilo (ACP, por sus siglas en inglés) de la enzima FASN. La cadena del ácido graso se formará a partir de la iteración de cuatro reacciones diferentes: condensación, reducción del grupo carbonilo, deshidratación y reducción del doble enlace. Las cuatro reacciones las lleva a cabo la enzima FASN. Partiendo de una molécula de acetil-CoA, en cada iteración se añade un malonyl-CoA a la cadena preexistente. Por lo tanto, cada ciclo añade dos carbonos a la cadena de ácido graso. Tras 7 ciclos se obtiene una molécula de ácido palmítico (Tracey *et al.*, 2018). En las diferentes reacciones de reducción implicadas se utiliza como dador de electrones la coenzima NADPH (Lunt and Vander Heiden, 2011).

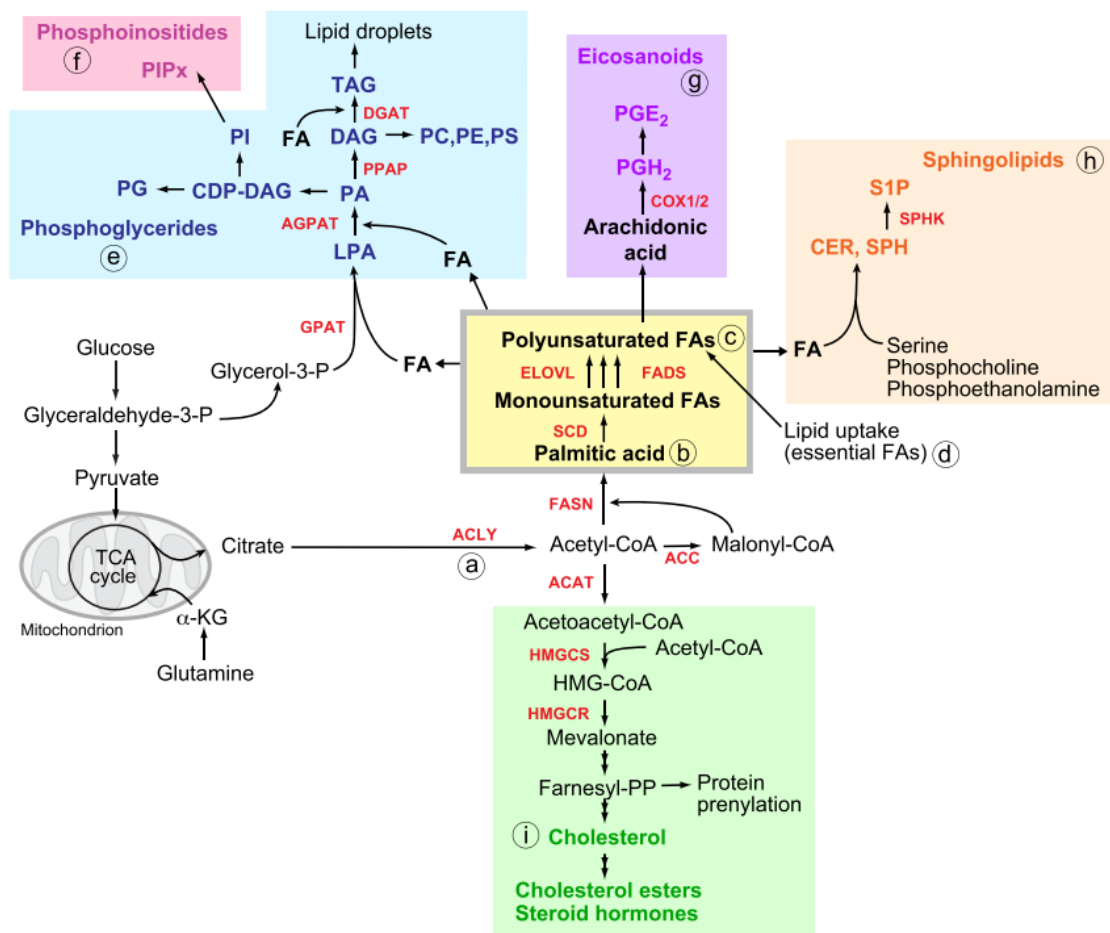


Figura 5: Vías metabólicas implicadas en la síntesis de lípidos como los ácidos grasos, el colesterol, los fosfoglicéridos, los eicosanoides o los esfingolípidos. La glucosa y la glutamina dan lugar a citrato, que es convertido en acetil-CoA por la ACLY. Para la síntesis de ácidos grasos, dos moléculas de acetil-CoA son unidas en una de malonil-CoA. A partir de la repetida condensación de malonil-CoA con aceil-CoA tiene lugar la síntesis del ácido palmítico. Los ácidos grasos pueden sufrir diferentes modificaciones como la formación de enlaces dobles a lo largo de su cadena que tiene como producto los ácidos grasos insaturados. Los ácidos grasos pueden unirse con el glicerol-3-fosfato para dar lugar a fosfoglicéridos o fosfatidilinosítoles. La síntesis del colesterol se inicia con la conversión del acetil-CoA en acetoacetyl-CoA. Adaptado (Baenke *et al.*, 2013).

Los ácidos grasos pueden sufrir diferentes modificaciones. El ácido palmítico puede ser alargado para dar lugar a esterato (18:0) o a otros ácidos grasos de mayor longitud mediante diferentes reacciones que tienen lugar en el retículo endoplasmático liso, en la mitocondria o en los peroxisomas (Tracey *et al.*, 2018). Los ácidos grasos también pueden ser sometidos a reacciones de desaturación, introduciendo dobles enlaces en su estructura mediante la acción de las enzimas conocidas como acil-CoA desaturasa. Por ejemplo, la enzima $\Delta 6$ desaturasa (FADS2), la encargada de reducir el ácido eicosapentaenoico para dar lugar a DHA, se expresa tanto en neuronas de la retina como del hipocampo (Cazzin *et al.*, 2011; Simón *et al.*, 2016).

Los ácidos grasos pueden combinarse mediante reacciones de esterificación con el glicerol-3-fosfato para dar lugar a diacilglicéridos (DAG) o triacilglicéridos (TAG). El proceso de síntesis tiene lugar en la superficie del retículo endoplasmático liso y en la membrana mitocondrial

interna. En el caso de los TAGs, la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) cataliza, en primer lugar, la adición de un ácido graso al C1 de una molécula de glicerol-3-fosfato dando lugar al ácido lisofosfatídico, a continuación, la 1-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferasa (AGPAT) cataliza la adición de un segundo ácido graso al C2 dando lugar al ácido fosfatídico y por último la fosfatasa del ácido fosfatídico (PAP) elimina el grupo fosfato de este último y la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) transfiere el último ácido graso al C3(Tracey *et al.*, 2018). Los TAGs son utilizados principalmente en el almacenamiento de energía en forma de gotas lipídicas. Sin embargo los DAGs son destinados a la síntesis de fosfoglicéridos como la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilglicerol o la fosfatidilserina, que son el componente básico de las membranas celulares (Baenke *et al.*, 2013).

Existen muy pocas referencias sobre el origen de los precursores utilizados en la síntesis de lípidos en el cerebro. Tal como se muestra en la Figura 9 los intermediarios de la glucólisis pueden ser utilizados como precursores en la síntesis de lípidos (Heiden, Cantley and Thompson, 2009). La glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD1, por sus siglas en inglés) cataliza la conversión de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP, por sus siglas en inglés) en glicerol-3-fosfato, utilizado como núcleo de glicerol en la síntesis de fosfolípidos. El piruvato puede ser transportado a la mitocondria donde, tras incorporarse al ciclo de Krebs, puede dar lugar a citrato, que podrá ser finalmente oxidado y descarboxilado o exportado al citoplasma donde gracias a la actividad de la ATP-citrato liasa (ACLY) puede dar lugar a oxalacetato y acetil-CoA, el principal precursor utilizado en la síntesis de lípidos(Lunt and Vander Heiden, 2011).

Existen numerosas referencias que relacionan el desarrollo del cerebro con cambios en el metabolismo de la glucosa (Cheng *et al.*, 2000; Pierre and Pellerin, 2005; Simpson, Carruthers and Vannucci, 2007; Goyal *et al.*, 2014; Blazey, Abraham Z Snyder, *et al.*, 2018; Goyal and Raichle, 2018). El consumo cerebral de glucosa al nacer es un 30% superior que en la edad adulta. No obstante, entre el nacimiento y los tres primeros años de vida experimenta un incremento hasta que entre los tres y los seis años el valor se incrementaba hasta llegar incluso a duplicarse. A partir de esta edad, empieza a disminuir hasta que, alrededor de los 15 años, alcanza el valor de adultos (Goyal *et al.*, 2014; Goyal and Raichle, 2018). Este incremento en el consumo de glucosa durante la infancia coincide con el período de mayor crecimiento axonal y dendrítico y con una mayor densidad sináptica y dendrítica, mientras que la reducción a partir de los 15 años coincide con el proceso de poda sináptica (Petanjek *et al.*, 2011; Goyal *et al.*, 2014; Silbereis *et al.*, 2016; Goyal and Raichle, 2018). En el cerebro adulto también se ha observado que las regiones con una mayor tasa glicolítica presentan un mayor nivel de expresión de genes relacionados con el crecimiento de dendritas y axones (Goyal *et al.*, 2014).

5.2 El metabolismo de la glucosa en el sistema nervioso.

Teniendo en cuenta su tamaño, el cerebro humano tiene un requerimiento energético muy elevado. Consume casi el 20% de la energía del cuerpo en reposo mientras que representa únicamente el 2% del peso corporal (Laughlin, De Ruyter Van Steveninck and Anderson, 1998). Esta elevada proporción se mantiene constante a no ser que se dé alguna patología (Jauch-Chara and Oltmanns, 2014) o en el caso de que el cerebro responda a estímulos externos (Giove *et al.*, 2003).

Tradicionalmente la glucosa ha sido considerada como la principal fuente de materia y energía del sistema nervioso en mamíferos. No obstante, numerosos estudios han demostrado que, aunque no pueden reemplazarla completamente, existen otras posibles fuentes como lactato, los cuerpos cetónicos o incluso el glutamato que pueden suplementarla (Van Hall *et al.*, 2009; Lutas and Yellen, 2013; Divakaruni *et al.*, 2017).

5.2.1 Transporte de la glucosa en el sistema nervioso.

La glucosa es una molécula polar que circula libremente por el torrente sanguíneo. Para poder ser metabolizada en el cerebro tiene que atravesar 2 barreras diferentes: la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) y la membrana plasmática.

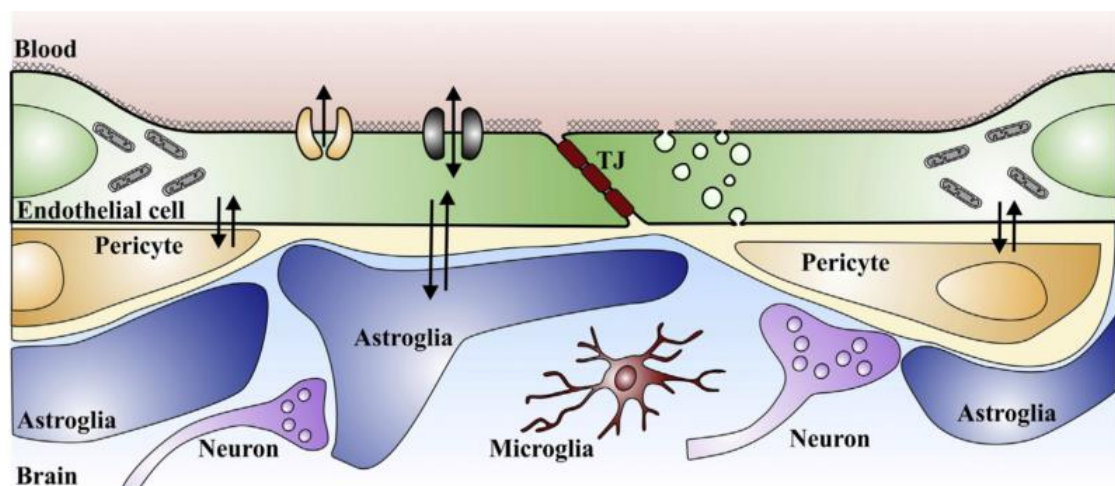


Figura 6: Esquema de los diferentes tipos celulares relacionados con la BBB. Las uniones estrechas entre las células endoteliales forman una barrera que evita la difusión de cualquier sustancia entre las mismas. Los diferentes nutrientes son transportados desde el corriente sanguíneo mediante diferentes transportadores, por difusión pasiva o por transcitosis. Los pericitos regulan el estado de los vasos sanguíneos y la astroglia el transporte de nutrientes, puesto que extiende su citoplasma a lo largo de la superficie de las células endoteliales. Adaptada (Campos-Bedolla *et al.*, 2014).

La BBB es una estructura funcional altamente selectiva encargada de regular el transporte de sustancias entre la sangre y el CNS (Patching, 2017). Como se observa en la Figura 6, a nivel

celular está formada por las células endoteliales de la microvasculatura del CNS y los pericitos, astrocitos, células de la microglia y neuronas que la rodean (Campos-Bedolla *et al.*, 2014). La interacción entre estas células constituye una unidad funcional, la unidad neurovascular (NVU, por sus siglas en inglés). Las células endoteliales, conectadas mediante uniones estrechas, conforman capilares no fenestrados continuos. Esta estructura característica, juntamente con el hecho de que el endotelio del CNS presenta una menor tasa de transcitosis, permite limitar el flujo paracelular de sustancias (Daneman and Prat, 2015). La mayor parte de los nutrientes que llegan al CNS a través de la BBB lo hacen por difusión pasiva, en el caso de pequeñas moléculas lipofílicas, mediante transportadores de solutos o por transcitosis mediada por receptores (Campos-Bedolla *et al.*, 2014).

Tabla 1: Transportadores de glucosa en el CNS. Adaptada (Szablewski, 2017).

Gen	Transportador	Localización	Substrato	Características
SLC2A1	GLUT1	-Isoforma 55kDa: Células endoteliales de la BBB, vasculatura cerebral, nervios periféricos, barreras epiteliales, neuronas del hipocampo. -Isoforma 45kDa: Astrocitos.	Glucosa, galactosa, manosa, glucosamina, ácido ascórbico.	Principal transportador de glucosa en el CNS
SLC2A2	GLUT2	Astrocitos, oligodendrocitos, neuronas	Manosa, fructosa, galactosa, glucosa, glucosamina.	Implicado en la regulación de la liberación de neurotransmisores y en la liberación de glucosa por las células gliales
SLC2A3	GLUT3	Neuronas	Glucosa, manosa, maltosa, xilosa, ácido dihidroascórbico.	Principal transportador en neuronas
SLC2A4	GLUT4	Algunas neuronas del encéfalo, neuronas del hipocampo y del cerebelo	Glucosa, glucosamina, ácido dihidroascórbico.	Sensible a la insulina
SLC2A5	GLUT5	Microglia del cerebro	Fructosa	Principal transportador de fructosa en el cuerpo
SLC2A6	GLUT6	Encéfalo	Glucosa	Transporte de hexosas entre orgánulos
SLC2A8	GLUT8	Encéfalo (cerebelo, neuronas), hipocampo, vesículas sinápticas del núcleo denso de los terminales nerviosos, gránulos de secreción de las neuronas de vasopresina	Glucosa	Localizado en la mayoría de los casos cerca del retículo endoplasmático rugoso
SLC2A10	GLUT10	Encéfalo	Glucosa, galactosa	Detectado a nivel de mRNA
SLC2A12	GLUT12	Corteza frontal	Glucosa	Poco estudiado
SLC2A13	GLUT13	Hipocampo, hipotálamo, cerebelo, tallo cerebral, vesículas intracelulares de las neuronas de encéfalo	H ⁺ /mio-inositol	Transporte de mio-inositol acoplado a H ⁺

El transporte de la glucosa a través de la BBB se da por difusión facilitada catalizada por una familia de transportadores de glucosa (GLUT) codificados por los genes *SLC2* (*solute carrier family 2*) y por transporte activo catalizado por una familia de cotransportadores dependientes de sodio (*SGLT*) codificados por los genes *SLC5* (Szablewski, 2017), siendo el primero el de mayor relevancia.

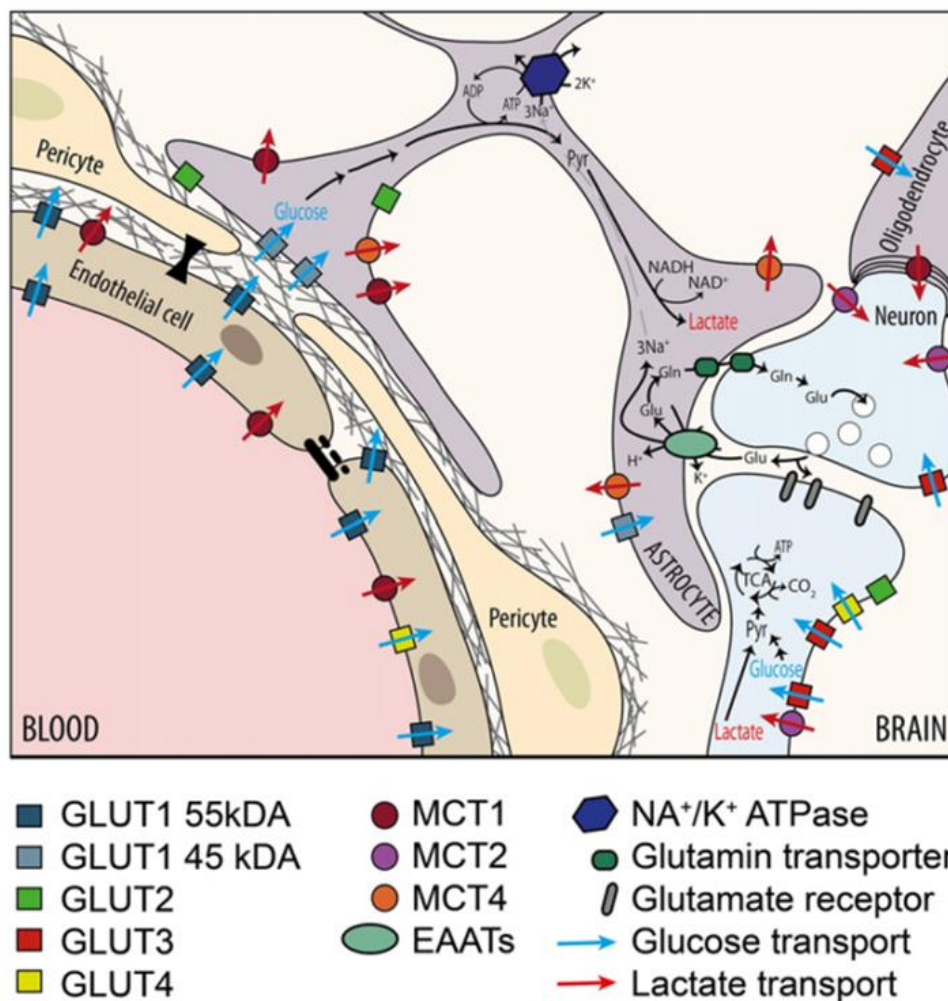


Figura 7: Transporte de glucosa y lactato en la BBB. El principal transportador de glucosa en la BBB es Glut1, mientras que el principal transportador en neuronas es Glut3. La forma de 55kDa de Glut1 se expresa únicamente en las células endoteliales mientras que la de 45 kDa se expresa principalmente en las células de la glía. Adaptada (Weiler *et al.*, 2017).

En humanos, se han descrito hasta 14 isoformas diferentes (GLUTs 1-14) de la familia *SLC2*. En la Tabla 1 se resumen los diferentes transportadores de esta familia encontrados en el CNS junto con sus características básicas. Todas ellas son glicoproteínas con 12 dominios transmembrana, con una N-glicosilación y ambas regiones, N-terminal y C-terminal, dirigidas hacia el citoplasma (Szablewski, 2017). En el CNS las isoformas más expresadas y los principales transportadores de glucosa son GLUT1 y GLUT3, codificadas por los genes *SLC2A1* y *SLC2A3* respectivamente (Vannucci *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 2008). Existen dos isoformas diferentes de GLUT1 en el cerebro que se diferencian en el nivel de glicosilación: la forma más glicosilada, de 55kDa, y la forma menos glicosilada, de 45kDa. La primera se expresa en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, tanto en la membrana luminal como en la abluminal, mientras que la segunda se expresa principalmente en células de la glía (astrocitos y oligodendrocitos) (Vannucci *et al.*, 1998). Aunque también ha sido descrita su presencia en

neuronas (Iwabuchi and Kawahara, 2011), la proteína GLUT3 es generalmente considerado como un transportador de glucosa específico de neuronas. Dada la elevada demanda de glucosa de las neuronas, no es de extrañar que GLUT3 tenga tanto una mayor afinidad por la glucosa como una mayor capacidad de transporte que GLUT1 (Simpson *et al.*, 2008). Durante el desarrollo cerebral los niveles de expresión de GLUT3 se incrementan coincidiendo con el período de máxima sinaptogénesis (Simpson *et al.*, 2008). De acuerdo con estos resultados, Ferreira y colaboradores demostraron que la actividad sináptica promueve la expresión de GLUT3 en la membrana plasmática, promoviendo de esta forma la captación de glucosa (Ferreira, Burnett and Rameau, 2011).

En ratas se ha descrito que la concentración de la glucosa en el cerebro es de entre el 20 y el 30% de la concentración en sangre (Silver and Erecińska, 1994; De Vries *et al.*, 2003). Como puede apreciarse en la Figura 7, el gradiente de concentración promueve el transporte de glucosa a través de la isoforma más glicosilada de GLUT1. Tras atravesar la BBB y llegar al líquido intersticial cerebral, la glucosa es captada mediante los transportadores GLUT1 (isoforma 45kDa) y GLUT3 presentes en la superficie de la membrana de astrocitos y neuronas, respectivamente. Para asegurar la continua captación de glucosa a favor del gradiente de concentración la glucosa intracelular es inmediatamente fosforilada por la enzima Hexokinasa (HK), dando lugar a la glucosa-6-fosfato (Glc-6-P) (Mergenthaler *et al.*, 2013). En mamíferos existen 4 isoformas diferentes de esta proteína (HK1-4). HK1 es la forma mayoritaria, ya que se expresa de forma constitutiva en la mayoría de tejidos. No obstante, su expresión es particularmente elevada en el cerebro (Wilson, 2003). HK2 se encuentra ampliamente expresada por tejidos sensibles a la insulina, tales como el músculo esquelético o el tejido adiposo, así como en un gran número de cánceres (Robey and Hay, 2006). HK1 y HK2 son las únicas isoformas con la capacidad de unirse a la mitocondria mediante la interacción con el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, por sus siglas en inglés) por el lado citoplasmático de la membrana externa de la mitocondria (OMM, por sus siglas en inglés) (Lunt and Vander Heiden, 2011). Esto permite que la HK tenga un mayor acceso al ATP generado en la mitocondria para poder fosforilar la glucosa (Arora and Pedersen, 1988; Calmettes *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha comprobado que el reclutamiento de la HK a la mitocondria previene la muerte celular por apoptosis (Bryson *et al.*, 2002; Majewski *et al.*, 2004). En cultivos primarios de neuronas corticales se observó que la sobreexpresión de HK2 previene la muerte celular tras someter a las neuronas a hipoxia (Mergenthaler *et al.*, 2012).

5.2.2 La glucosa en la célula.

A partir de este punto, la glucosa tiene cuatro destinos diferentes en la célula: la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato (PPP, por sus siglas en inglés), la biosíntesis de las hexosaminas y finalmente el almacenamiento en forma de glicógeno.

5.2.2.1 Glucólisis:

Esta vía metabólica está considerada el pilar central del metabolismo de la glucosa. Juega un papel clave tanto en la producción de energía y poder reductor como en la síntesis de metabolitos esenciales para la posterior síntesis de un amplio abanico de biomoléculas. Tal como se observa en la Figura 8, consta de 10 reacciones enzimáticas diferentes, a partir de las cuales se genera un total de dos moléculas de ATP, dos moléculas de NADH y finalmente dos moléculas de piruvato por cada molécula de glucosa. El piruvato sintetizado a partir de la glucólisis puede tener diferentes destinos: transformación en acetil-CoA para incorporarse al ciclo de Krebs, reducción en lactato o síntesis de alanina.

Para incorporarse al ciclo de Krebs el piruvato es transportado al interior de la mitocondria, donde es descarboxilado por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH), dando lugar a una molécula de acetil-CoA. Tras incorporarse al ciclo de Krebs, el acetil-CoA es oxidado generando dos moléculas de CO₂, una de GTP, una de FADH₂ y tres de NADH. Las moléculas de coenzimas, FADH₂ y NADH, son 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. Por lo tanto, teniendo en cuenta el paso tanto por la glucólisis como por el ciclo de Krebs, por cada molécula de glucosa puede generarse hasta un total de 38 moléculas de ATP.

La encima encargada de catalizar la reducción del piruvato en lactato es la lactato deshidrogenasa (LDH). La importancia de esta reacción reside en el hecho de que permite regenerar la coenzima NAD⁺ reducida durante la glucólisis sin recurrir a la cadena de transporte de electrones. El lactato sintetizado es finalmente liberado al medio mediante un transportador de monocarboxilato (MCT, por sus siglas en inglés).

El piruvato también está implicado en la síntesis de aminoácidos, concretamente la alanina. La enzima alanina transaminasa (ALT) cataliza la transferencia de un grupo amino del glutamato al piruvato dando lugar a alanina y α -cetoglutarato. En los casos en que el flujo glicolítico es claramente superior a la actividad del complejo PDH, los niveles de piruvato citoplasmático se incrementan promoviendo la actividad tanto de la ALT como de la LDH (Lunt and Vander Heiden, 2011). El piruvato también puede estar implicado en reacciones anapleróticas para proporcionar intermediarios al ciclo de Krebs. Concretamente, el piruvato puede ser carboxilado por la piruvato carboxilasa (PC) para dar lugar a oxalacetato.

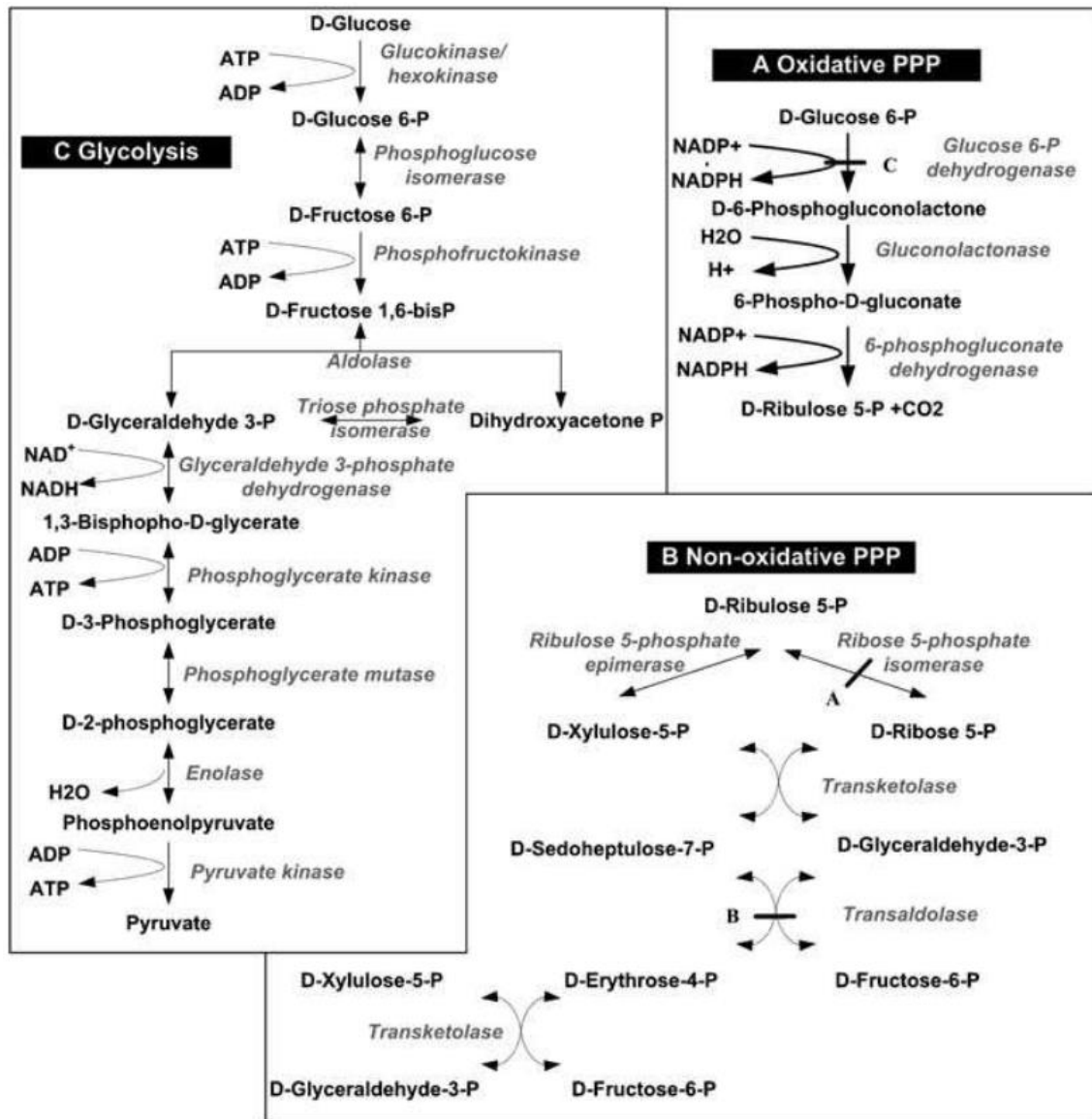


Figura 8: Representación esquemática de las vías implicadas en el metabolismo de la glucosa. A) Vía oxidativa de la PPP. B) Vía no oxidativa de la PPP. C) Glucólisis. Adaptado (Wamelinck, Struys and Jakobs, 2008).

La glucólisis presenta tres enzimas limitantes diferentes, que regulan su flujo metabólico: la HK, la fosfofructoquinasa-1 (PFK1, por sus siglas en inglés) y la piruvato quinasa (PK). Las reacciones catalizadas por estas tres enzimas son, en condiciones fisiológicas, irreversibles. Su actividad puede ser regulada tanto a nivel enzimático, alostéricamente, como a nivel transcripcional.

La HK, descrita anteriormente, cataliza la primera reacción de la glucólisis: la fosforilación de la glucosa con el consiguiente consumo de una molécula de ATP. El producto de la HK, la glucosa-6-fosfato es un inhibidor alostérico de la misma, excepto en el caso de la isoforma HK4, expresada únicamente en páncreas e hígado. Por otro lado, se ha visto que el fosfato inorgánico

puede actuar como un activador, en el caso de la isoforma HK1, o como un inhibidor en el caso de las isoformas HK2 y HK3. Sugiriendo un rol catabólico para la primera isoforma y un rol anabólico para las dos últimas (Robey and Hay, 2006).

La PFK1 es la enzima encargada de catalizar la tercera reacción de la glucólisis: la fosforilación de la de fructosa-6-fosfato dando lugar a la fructosa-1,6-bifosfato. Como en el caso anterior, esta enzima está regulada alostéricamente, en función de los requerimientos energéticos de la célula su actividad enzimática se verá inducida o reprimida. La acumulación en el citoplasma de ATP o de citrato (proveniente del ciclo de Krebs) inhibe la actividad de la PFK1, mientras que la acumulación de ADP o AMP la inducen. No obstante, el principal activador de la PFK1 es la fructosa-2,6-bifosfato. Cuando esta molécula interacciona de forma alostérica con la PFK1 ve incrementada la afinidad por su substrato, la fructosa-6-fosfato. La síntesis de la fructosa-2,6-bifosfato a partir de la fructosa-6-fosfato la cataliza una familia de enzimas conocidas como 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa (PFKFB, por sus siglas en inglés). Estas enzimas catalizan tanto la síntesis de fructosa-2,6-bifosfato (actividad quinasa/PFK) como su degradación (actividad fosfatasa/FBP) (Porporato *et al.*, 2011). El comportamiento de esta enzima como quinasa o fosfatasa se regula por fosforilación (Ros and Schulze, 2013). En hepatocitos de rata, por ejemplo, la fosforilación de PFKFB por la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA, por sus siglas en inglés) inhibe la actividad quinasa, promoviendo la actividad fosfatasa (el-Maghrabi *et al.*, 1982; Bartrons *et al.*, 1983). En mamíferos, existen 4 isoformas diferentes (PFKFB1-4). Todas ellas con actividad quinasa y fosfatasa por igual, a excepción de PFKFB3, que funciona principalmente como una quinasa (Mor, Cheung and Vousden, 2011). Esta última induce en gran medida el flujo glicolítico y está ampliamente expresada en células tumorales (Porporato *et al.*, 2011). Sin embargo, en neuronas en reposo PFKFB3 es constantemente degradada por el proteasoma (Herrero-Mendez *et al.*, 2009).

La tercera enzima limitante es la PK, la encargada de catalizar la última reacción de la glicólisis: la defosforilación del fosfoenolpiruvato (PEP, por sus siglas en inglés), dando lugar a piruvato y ATP. Existen 4 isoformas diferentes de esta proteína: PKM1, PKM2, PKL y PKR. Las dos primeras están codificadas por el gen *PKM* y las dos últimas por el gen *PKLR*. En ambos casos las respectivas isoformas se generan por *splicing* alternativo (Yang and Lu, 2015). PKR se expresa exclusivamente en eritrocitos mientras que PKL lo hace principalmente en el hígado y en menor medida en riñón. PKM1, por otro lado, se expresa constitutivamente en la mayoría de tejidos completamente diferenciados, como el corazón, el cerebro o el músculo, mientras que PKM2 la forma característica de tejidos en desarrollo o de células tumorales (Li *et al.*, 2018). En mamíferos, la piruvato quinasa polimeriza, alternando entre un homotetrámero, la forma de mayor actividad enzimática, y un homodímero, la de menor actividad enzimática. Como en los casos anteriores la PK también puede ser regulada alostéricamente. Así, por ejemplo, la L-cisteína inhibe su

actividad, mientras que la serina y la fructosa-1,6-bifosfato la inducen (Jurica *et al.*, 1998; Chaneton *et al.*, 2012; Nakatsu *et al.*, 2015). La actividad de PK también puede ser regulada a nivel postraduccional. En células tumorales se ha observado que la fosforilación de un residuo de tirosina impide la unión del activador alostérico fructosa-1,6-bifosfato, impidiendo la formación del tetrámero de PKM2, su forma activa (Hitosugi *et al.*, 2009).

Al margen de su papel en la glucólisis, PKM2 puede participar en otros procesos celulares. En su forma dimérica puede interactuar con el factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α , por sus siglas en inglés) para activar la expresión de diferentes enzimas glicolíticas (Luo *et al.*, 2011). Este aspecto es clave para entender el papel de PKM2 en el crecimiento y la proliferación celular. A pesar de que PKM1 es ideal para tejidos con una elevada demanda de ATP, ya que se encuentra constitutivamente activa, las células con una elevada tasa de crecimiento y proliferación, como las células tumorales, expresan mayormente PKM2. La actividad de esta isoforma puede ser inhibida, reduciendo la generación de ATP y piruvato y promoviendo la síntesis de diferentes metabolitos intermediarios como el 3-fosfoglicerato, precursor de la serina o la glicina (Figura 9) (Lunt and Vander Heiden, 2011).

Aunque no forma parte de la glicólisis, la enzima PDH también puede ser considerada una enzima limitante en el catabolismo de la glucosa. La PDH forma parte del complejo homónimo, siendo la subunidad E1 del mismo. En eucariotas el resto de componentes son la dihidrolipoil transacetilasa o subunidad E2 (DLAT), la dihidrolipoil deshidrogenasa o subunidad 3 (DLD), y por último la proteína de unión a E3 (E3BP, por sus siglas en inglés). El complejo PDH cataliza la transformación de piruvato en acetil-CoA en la matriz mitocondrial. Cuando la subunidad PDH es fosforilada, su actividad queda reprimida. Las enzimas encargadas de fosforilar y defosforilar la PDH son la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK, por sus siglas en inglés) y la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDP, por sus siglas en inglés), respectivamente. Ambas se encuentran asociadas con el complejo PDH (Lunt and Vander Heiden, 2011; Porporato *et al.*, 2011; Stacpoole, 2017). En mamíferos existen cuatro isoformas de PDK diferentes (PDK1-4). Su nivel de expresión varía en función del tipo de tejido. PDK1, por ejemplo, se expresa principalmente en corazón, páncreas y músculo esquelético, mientras que PDK3 se expresa únicamente en testículos, riñón y cerebro (Sugden and Holness, 2003). También existen diferencias con relación a su nivel de actividad y a sus mecanismos de regulación (Stacpoole, 2017). Tanto el acetil-CoA como el NADH y el ATP estimulan la actividad de las PDKs, mientras que el ADP, el NAD⁺, el CoA-SH y el piruvato la inhiben. No obstante, cada isoforma presenta una sensibilidad diferente a cada metabolito (Saunier, Benelli and Bortoli, 2016). También se han descrito diferencias con respecto a su regulación a nivel transcripcional. Por ejemplo, el factor de transcripción HIF-1 α únicamente activa la expresión de PDK1 y PDK3 (Kim *et al.*, 2006; Papandreou *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2008).

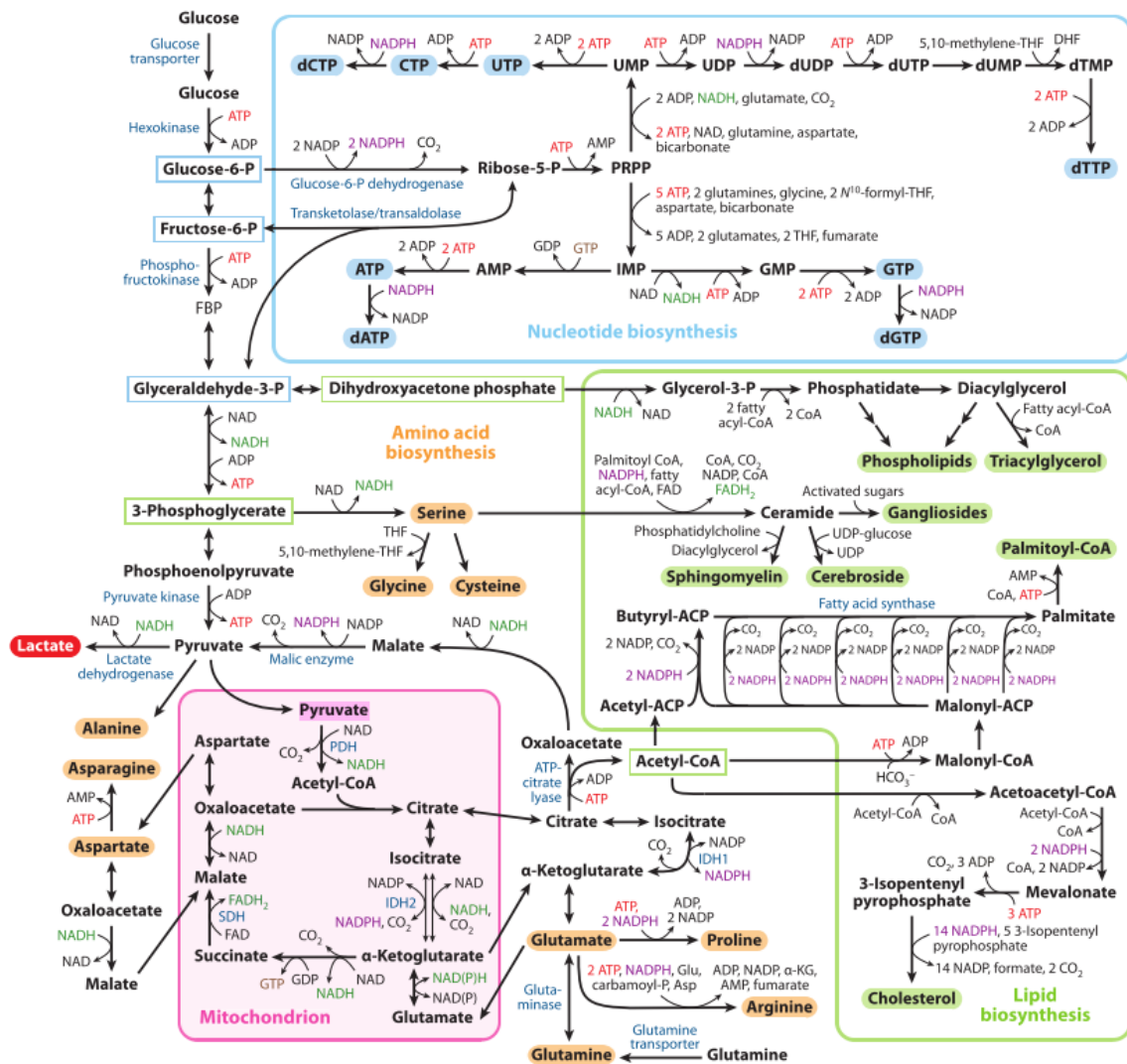


Figura 9: Vías metabólicas implicadas en la proliferación y el crecimiento celular. Este esquema resume cómo la glucólisis, la PPP, la fosforilación oxidativa y el metabolismo de la glutamina contribuyen a la síntesis de precursores destinados a la síntesis de los metabolitos básicos necesarios para el crecimiento y la proliferación celular. Las vías implicadas en la síntesis de lípidos, de especial interés para este trabajo, están marcadas de color verde. Adaptada (Lunt and Vander Heiden, 2011).

5.2.2.2 Vía de las pentosas fosfato (PPP):

La PPP es la principal fuente de poder reductor en forma de NADPH en las células de mamíferos. La importancia de este agente reductor reside en su papel en numerosas reacciones de biosíntesis (lipogénesis, biosíntesis del colesterol...) y en la regeneración del principal antioxidante a nivel celular, el glutatión (GSH), a partir de su forma oxidada (GSSG). Está dividida en dos fases: la vía oxidativa y la vía no oxidativa. En la primera, a partir de una molécula de glucosa-6-fosfato se sintetiza una molécula de ribulosa-5-fosfato con la consiguiente producción de una molécula de CO₂ y dos de NADPH (Lunt and Vander Heiden, 2011; Stincone *et al.*, 2015). La enzima limitante de esta vía es la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD, por sus siglas en inglés). Es la encargada de catalizar la primera reacción de esta vía, la conversión de

la glucosa-6-fosfato en 6-fosfoglucono- δ -lactona, acoplada a la reducción de dos moléculas de NADP⁺ (Tang, 2019). Han sido descritos diferentes elementos implicados en su regulación. El primero de estos es la ratio NADPH/NADP. La PPP está implicada en la defensa contra el daño oxidativo. Por lo tanto, una reducción en esta ratio activa la G6PD y en consecuencia el flujo de glucosa hacia esta vía. Otro elemento implicado en la regulación de esta enzima es el cAMP Y la PKA. El incremento en los niveles de esta molécula y en consecuencia la activación de esta quinasa inhiben la actividad de la G6PD (Stanton, 2012). La ribulosa-5-fosfato generada entra en la vía no oxidativa donde puede ser convertida en ribosa-5-fosfato por la ribosa-5-fosfato isomerasa (RPI, por sus siglas en inglés) o en xilulosa-5-fosfato por la ribulosa-5-fosfato epimerasa (RPE, por sus siglas en inglés). Como se observa en la Figura 9, el primer metabolito, la ribulosa-5-fosfato, es esencial en la síntesis de nucleótidos. La combinación de ambas en la reacción catalizada por la enzima transcetolasa (TKL, por sus siglas en inglés) da lugar a una molécula de gliceraldehido-3-fosfato y otra de sedoheptulosa-7-fosfato. A su vez, ambos metabolitos pueden reaccionar entre sí dando lugar a una molécula de fructosa-6-fosfato y otra de eritrosa-4-fosfato. La enzima de catalizar esta última reacción es la transaldolasa (TAL). Tanto el gliceraldehido-3-fosfato como la fructosa-6-fosfato son intermediarios de la glucólisis y pueden por lo tanto reincorporarse en esta última esta vía (Figura 9) (Wamelink, Struys and Jakobs, 2008; Lunt and Vander Heiden, 2011; Stincone *et al.*, 2015).

La ribosa-5-fosfato es un metabolito precursor para la síntesis de nucleótidos y coenzimas. En cambio, el NADPH es utilizado como agente reductor tanto en vías anabólicas como en mecanismos de protección contra el daño oxidativo, ya que, entre otros aspectos, es necesario para regenerar el glutatión, uno de los principales antioxidantes a nivel celular. No obstante, la PPP también presenta una fase no oxidativa que permite la regeneración de hasta 5 moléculas de glucosa-6-fosfato a partir de 6 moléculas de ribosa-5-fosfato. Por otro lado, la eritrosa-4-fosfato se utiliza como metabolito precursor en la síntesis de la histidina y otras biomoléculas como la vitamina B6 (Stincone *et al.*, 2015).

En neuronas la PPP es especialmente relevante dado que son células especialmente sensibles al daño oxidativo (Halliwell, 2006). Tal como se ha indicado previamente, en neuronas la enzima PFKFB3 es degradada continuamente para reducir el flujo glicolítico y dirigir más glucosa hacia la PPP (Herrero-Mendez *et al.*, 2009).

5.2.2.3 Biosíntesis de la hexosaminas:

Entre un 2 y un 5% de la fructosa-6-fosfato se destina a la vía de biosíntesis de las hexosaminas. La importancia de esta vía reside en el hecho de que el producto principal, la 5-difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) es el sustrato de toda una larga lista de enzimas

implicadas en O-GlcNAcilación de proteínas. Esta modificación postraduccional juega un papel clave en la remodelación de histonas, en la transcripción, en la apoptosis, en la proliferación o en la degradación de proteínas mediante el proteasoma (Love and Hanover, 2005; Wellen *et al.*, 2010).

Esta vía metabólica puede dividirse en dos fases: la síntesis de la UDP-GlcNAc y la transferencia o la eliminación de la O-GlcNAc. La enzima limitante de esta vía, la L-glutamina D-fructosa-6-fosfatoamidotransferasa (GFAT), cataliza la primera reacción de la misma, la conversión de la fructosa-6-fosfato en glucosamina-6-fosfato. La actividad de esta enzima es inhibida por la UDP-GlcNAc por un mecanismo de retroalimentación negativa por la UDP-GlcNAc. La vía de biosíntesis de las hexosaminas puede ser considerada un sensor de nutrientes, ya que los niveles de UDP-GlcNAc varían en función de los niveles de glucosa en el medio. Estos cambios se transmiten a nivel celular mediante la O-GlcNAc transferasa (OGT) y la O-GlcNAcase, las enzimas encargadas de transferir o eliminar la O-GlcNAc (Love and Hanover, 2005).

5.2.2.4 Síntesis de glicógeno:

En el sistema nervioso el glicógeno se almacena casi exclusivamente en los astrocitos. A nivel de CNS, las regiones con mayores niveles de glicógeno son el hipocampo, el estriado, la corteza cerebral y la capa molecular del cerebelo, curiosamente, las regiones con una mayor demanda a nivel metabólico (Oe *et al.*, 2016). Se cree que el glicógeno acumulado en los astrocitos podría actuar como una reserva a nivel local. Los astrocitos mantendrían los requerimientos energéticos de las neuronas degradando el glicógeno almacenado y liberándolo en forma de lactato (Waitt *et al.*, 2017).

Aunque las neuronas poseen la maquinaria necesaria para la síntesis del glicógeno, ya que expresan la glicógeno sintasa (GS), su actividad se encuentra reprimida. En caso contrario, se ha comprobado que su hiperactivación en neuronas promueve la acumulación de glicógeno y la generación de señales pro-apoptóticas (Vilchez *et al.*, 2007). Estudios más recientes, han descrito que, en situaciones patológicas, esta enzima podría jugar un papel neuroprotector. Saez y colaboradores demostraron que las neuronas no sólo pueden almacenar una muy reducida cantidad de glicógeno sino que además la activación de GS protege a las neuronas de la muerte inducida por hipoxia (Saez *et al.*, 2014). Recientemente, se ha demostrado que esta enzima juega un papel esencial en el proceso de plasticidad neuronal. Los ratones en que este gen había sido deletado de forma específica en neuronas piramidales postnatales de la corteza y del hipocampo experimentaban una mayor dificultad en el aprendizaje de tareas asociativas (Duran *et al.*, 2019). En línea con estos resultados, Rai y colaboradores demostraron que esta misma enzima

también protege a las neuronas de la citotoxicidad causada por la forma mutada de la Huntingtina promoviendo la autofagia. Además, también comprobaron que el incremento en los niveles de glucógeno neuronal inhibía la formación de agregados de Huntingtina (Rai *et al.*, 2018).

5.2.3 El metabolismo glicolítico y oxidativo en el sistema nervioso.

La mayor parte de la energía consumida por el cerebro es destinada al mantenimiento de la actividad sináptica (Mergenthaler *et al.*, 2013). La actividad sináptica promueve toda una serie de cambios a nivel metabólico en las diferentes regiones del cerebro para suplir el consiguiente incremento en el consumo de materia y energía. Esta serie cambios va desde un incremento en el flujo sanguíneo hasta el viraje de un metabolismo más oxidativo a uno más glicolítico.

Diferentes análisis mediante tomografía de positrones (PET, por sus siglas en inglés) en humanos adultos han demostrado que el consumo de glucosa en el cerebro o índice metabólico cerebral de la glucosa (CMR_{glc} , por sus siglas en inglés) y el de oxígeno o índice metabólico cerebral de oxígeno (CMR_{O_2} , por sus siglas en inglés) están prácticamente equilibrados. En estas condiciones la glucosa es oxidada casi por completo hasta CO_2 . La estequiometría esperada para este proceso es de 6 moléculas de O_2 por cada una de glucosa ($6 O_2 + 1 \text{ Glucosa} \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$). El índice oxígeno-glucosa (OGI, por sus siglas en inglés) se define como la ratio CMR_{O_2}/CMR_{glc} . Las estimaciones de la OGI en reposo oscilan alrededor de 5,5 (Blazey, Abraham Z. Snyder, *et al.*, 2018).

Hay que tener en cuenta que el cerebro ha sido descrito como el único órgano en el que la glucólisis y el consiguiente metabolismo oxidativo se encuentran acoplados (Hui *et al.*, 2017). Es decir, mientras que el resto de órganos pueden liberar a la sangre el lactato generado a partir del metabolismo de la glucosa o pueden oxidar el lactato proveniente de la circulación, el intercambio de lactato entre la sangre y el cerebro es prácticamente nulo. De este modo el cerebro sintetiza a partir de la glucosa los diferentes metabolitos intermediarios que finalmente serán oxidados en el propio tejido.

Tras la estimulación cerebral se observa una clara reducción del OGI. Tras comparar el CMR_{glc} , el CMR_{O_2} y el flujo sanguíneo en diferentes sujetos antes y después de exponerlos a un estímulo visual, se observó que mientras que el flujo sanguíneo y el CMR_{glc} se incrementaron aproximadamente en un 50%, el CMR_{O_2} lo hizo tan solo en aproximadamente un 5% (Fox *et al.*, 1988). Es decir, aproximadamente un 90% del incremento en la glucosa consumida no fue oxidada. En ratas sometidas a estimulación sensorial, el OGI pasó de $6,1 \pm 1,1$ en estado de reposo a $5,0 \pm 1,1$ durante el estímulo (Madsen *et al.*, 1999). Durante la estimulación los niveles de lactato en el cerebro se doblaron mientras que los de glucosa se mantuvieron constantes. Tanto el incremento en los niveles de lactato como la reducción del OGI se corresponden con la activación

de la glucólisis. Por último, se observó que 15 minutos tras la estimulación, el OGI se incrementó hasta $7,7 \pm 2,6$ mientras que los niveles de lactato volvieron a la normalidad. Estos resultados muestran como este cambio metabólico es transitorio, durante la activación de la glucólisis se acumulan metabolitos derivados de esta vía, como el lactato, que finalmente son oxidados tras finalizar la estimulación.

El hecho de que la glucosa sea oxidada en su práctica totalidad no quiere decir que cada una de las células del sistema nervioso lleve a cabo todo el proceso de forma ininterrumpida. La capacidad del cerebro de desacoplar el metabolismo glicolítico del oxidativo tras su activación ha llevado a considerar la posibilidad de que el metabolismo cerebral se encuentre compartimentalizado a nivel celular. El piruvato generado en la glucólisis puede ser oxidado en la mitocondria o reducido a lactato y liberado al medio. Esta última reacción puede ser reversible y el lactato podría ser captado y oxidado para dar de nuevo piruvato. Existe una amplia controversia con respecto al destino y el origen del lactato en el cerebro.

La hipótesis de la lanzadera de lactato astrocito-neurona (ANLS, por sus siglas en inglés) propone que la actividad neuronal induce la actividad glicolítica en astrocitos, promoviendo la liberación de lactato que finalmente es utilizado por las neuronas como fuente de energía (Magistretti *et al.*, 1993; Pellerin and Magistretti, 1994, 2012). Pellerin y Magistretti comprobaron que la aplicación de glutamato al medio de un cultivo puro de astrocitos incrementaba tanto la captación de [³H]-2-deoxiglucosa (2-DG; [³H]-2-DG) como la liberación de lactato. También se determinó que neuronas y astrocitos expresan isoformas diferentes tanto de LDH como de MCT (Bittar *et al.*, 1996; Pellerin *et al.*, 1998; Pierre *et al.*, 2000). Estos estudios mostraban que mientras que las isoformas LDH-1 y MCT2 se expresan mayormente en neuronas, las isoformas LDH-5 y MCT1 Y MCT4 se encuentran principalmente en astrocitos. MCT2, la isoforma neuronal, tiene una mayor afinidad por el lactato (Km de 0,7mM) que MCT1 y MCT4 (Km de 3,5 y 34 mM, respectivamente). Por otro lado, LDH-5 se ha relacionado con tejidos con un metabolismo más glicolítico, como las fibras musculares de contracción rápida, mientras que LDH-1 se ha relacionado con tejidos con un metabolismo más oxidativo, como el cardíaco. Esto podría ser debido a que la isoforma LDH-5 tiene una mayor $V_{m\acute{a}x}$ y por lo tanto una mayor capacidad de convertir el piruvato en lactato. Por lo tanto, las neuronas tendrían una mayor tendencia a captar lactato gracias a la presencia de la isoforma MCT2 y los astrocitos una mayor tendencia a generarlo debido a la expresión de la isoforma LDH-5.

Otro argumento a favor fue la disposición de las prolongaciones citoplasmáticas de determinados astrocitos alrededor de los capilares sanguíneos. Esta disposición les daría a los astrocitos un acceso preferente a la glucosa transportada por la sangre (Pellerin and Magistretti, 2012).

Sin embargo, existe una gran controversia con respecto a esta teoría (A. B. Patel *et al.*, 2014; Lundgaard *et al.*, 2015; Dienel and Cruz, 2016; Ashrafi and Ryan, 2017; Díaz-García *et al.*, 2017; Díaz-García and Yellen, 2018; Yellen, 2018). Uno de los mayores problemas de esta teoría es que la mayoría de experimentos en los que se fundamenta se han llevado a cabo en células en cultivo (Díaz-García and Yellen, 2018). Algunos de los argumentos presentados anteriormente han quedado en evidencia. Aplicando un método de crío-fijación, Korogod *et al.* comprobaron que el grado de cobertura de los vasos sanguíneos por los astrocitos era mucho menor del observado tras llevar a cabo una fijación química (Korogod, Petersen and Knott, 2015). Esta última metodología puede alterar el tejido causando la reducción del espacio intracelular. Por otro lado, se ha comprobado que, tanto a nivel de mRNA como de proteína, los niveles las diferentes isoformas de LDH son similares en neuronas y astrocitos (Yellen, 2018). Por último, mediante la generación de un modelo que simulaba el transporte de glucosa y lactato en el cerebro se demostró que MCT2 en concentraciones fisiológicas de lactato también es capaz de promover la liberación de lactato al medio (Simpson, Carruthers and Vannucci, 2007).

Diferentes estudios *in vivo* han demostrado que la estimulación neuronal promueve la captación de glucosa por las neuronas (A. B. Patel *et al.*, 2014; Lundgaard *et al.*, 2015; Díaz-García *et al.*, 2017). Esta glucosa es destinada principalmente a la glucólisis con el objetivo de generar energía en forma de ATP de forma rápida. Estos resultados sugieren que el piruvato oxidado por las neuronas puede provenir de la glucólisis y no del lactato liberado por los astrocitos (Lundgaard *et al.*, 2015).

5.2.4 La regulación del metabolismo de la glucosa por HIF-1 α .

HIF-1 es un factor de transcripción caracterizado por regular la respuesta adaptativa a hipoxia. Se trata de un heterodímero conformado por una subunidad α , degradada en presencia de oxígeno, y una subunidad β (también conocida como ARNT), expresada de forma constitutiva. Como se muestra en la Figura 10, ambas subunidades contienen un dominio estructural hélice-bucle-hélice-básico-PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS, por sus siglas en inglés) que median la dimerización y la interacción con el DNA (Wang *et al.*, 1995). HIF-1 β puede dimerizar con otras dos proteínas de la misma familia, HIF-2 α y HIF-3 α (Schito and Semenza, 2016).

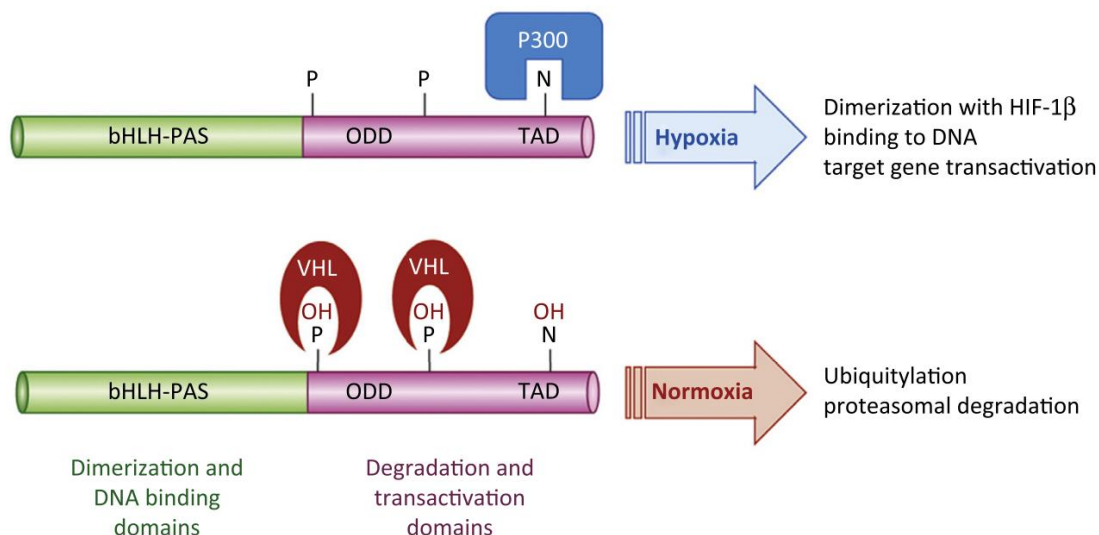


Figura 10: HIF-1 α se regula por la hidroxilación de los residuos prolina y asparagina localizados en los dominios ODD y de transactivación respectivamente. En condiciones de normoxia el residuo de asparagina (N) localizado en el dominio de transactivación (TAD) es hidroxilado por la enzima FIH, mientras que los residuos prolina (P) del dominio ODD son hidroxilados por las enzimas PHD. Las P hidroxiladas son reconocidas por la enzima ubiquitina ligasa VHL que marca HIF-1 α para su degradación por el proteasoma. En condiciones de hipoxia la reacción de hidroxilación queda inhibido, permitiendo la formación del heterodímero gracias al dominio PAS, la interacción con el DNA mediante el dominio bHLH y el consecuente reclutamiento de diferentes cofactores como p300 o CBP (Schito and Semenza, 2016).

Tras su activación, el heterodímero interacciona con el elemento de respuesta a hipoxia (HRE, por sus siglas en inglés) localizado en la región promotora de los genes regulados por HIF-1 (Semenza *et al.*, 1996). En normoxia, HIF-1 α es ubiquitinizado y degradado. Las enzimas prolin hidroxilasas (PHD) hidroxilan los residuos Pro-402 y Pro-564 localizados en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD, por sus siglas en inglés y a continuación el complejo ubiquitina ligasa von Hippel-Lindau (VHL) reconoce ambos residuos hidroxilados y marca HIF-1 α para su degradación (Maxwell *et al.*, 1999; Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Todo este proceso se resume en la Figura 11. Otro elemento regulador de la vía PHD/VHL es la E3 ubiquitina ligasa Siah2, que contribuye a la estabilización de HIF-1 α . Siah2 puede efectuar su función tanto interactuando directamente con sus sustratos o actuando como la subunidad esencial del dominio RING de complejos E3 mayores (Qi *et al.*, 2008). En cuanto a la estabilización HIF-1 α , puede llevarla bien mediante la degradación de la quinasa similar a Polo 3 (Plk3, por sus siglas en inglés), que fosforila y desestabiliza HIF-1 α (Li *et al.*, 2017) o bien mediante la degradación de las PHDs, concretamente de las isoformas PHD1 y 3 (Nakayama *et al.*, 2004).

La actividad de HIF-1 α puede ser inhibida por el factor inhibidor de HIF (FIH). Esta asparagina hidroxilasa hidroxila el residuo Asp-803 localizado en el extremo carboxilo-terminal del dominio transactivador de HIF-1 α (Mahon, Hirota and Semenza, 2001). A pesar de que HIF-1 α es degradada de forma constitutiva en normoxia, puede ser estabilizada en estas condiciones

como consecuencia de la presencia de factores de crecimiento, a la acumulación de determinados metabolitos, a la expresión de oncogenes o a la producción de ROS (Denko, 2008).

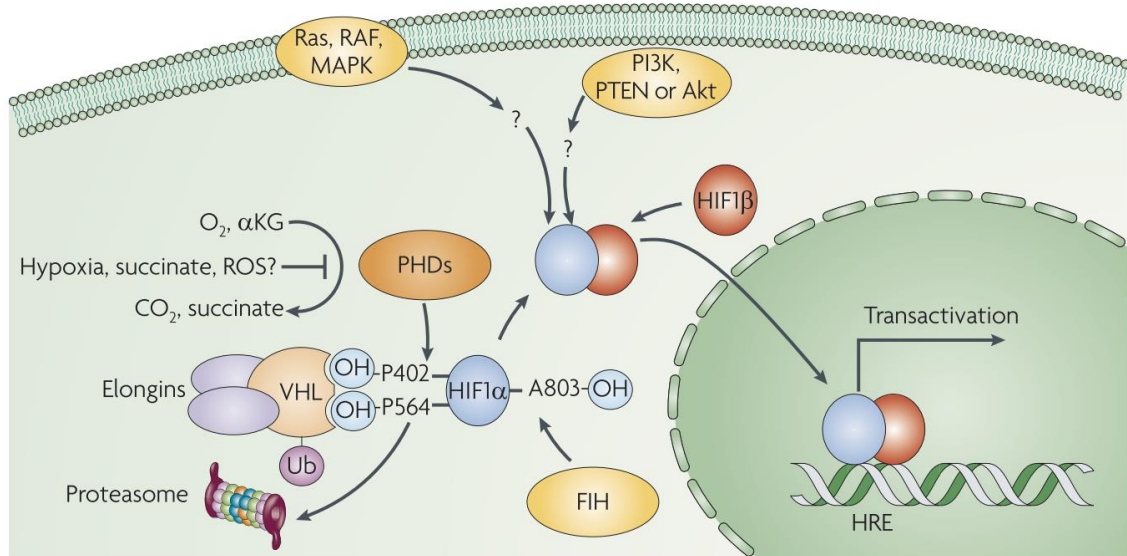


Figura 11: Mecanismos de regulación y estabilización de HIF-1α. El mecanismo más comúnmente estudiado es el llevado a cabo por las enzimas PHD. Esta ruta puede ser activada por las vías de señalización dirigidas por Akt y PI3K o por Ras y MAPK. Los ROS o diferentes intermediarios del ciclo de Krebs como son el α -cetoglutarato (α KG) o el succinato también pueden regular la actividad de las PHDs. Esto es debido a que estos metabolitos son utilizados por las PHDs como sustratos para llevar a cabo la reacción de hidroxilación. Adaptada (Denko, 2008).

HIF-1 está considerado como un factor clave en la regulación del metabolismo de la glucosa, media la transición de un metabolismo oxidativo a uno glucolítico promoviendo la expresión de diferentes genes implicados en el metabolismo oxidativo y glucolítico. Entre los genes regulados por HIF-1 se encuentran los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3, diferentes enzimas de la glucólisis como HK2, PFK1, PK y PFKFB1-4, LDHA, MCT4, PDK1 o incluso genes implicados en autofagia como BNIP3 y BNIP3L (Denko, 2008; Semenza, 2012).

Se ha demostrado que HIF-1 puede activar la glucólisis promoviendo, en primer lugar, la expresión de transportadores de la glucosa como GLUT1 (Chen *et al.*, 2001). GLUT1, juega un papel esencial para el transporte de glucosa hasta el cerebro (Huang *et al.*, 2012). También activa la expresión de las diferentes enzimas limitantes de la glucólisis, como HK2 y PKM2, y de las diferentes isoenzimas de PFKFB, la encima encargada de sintetizar el principal activador alostérico de PFK1 (Mathupala, Rempel and Pedersen, 2001; Minchenko *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2018). Por último, promueve la expresión de PDK1, que inhibe la conversión de piruvato en acetil-CoA fosforilando y por lo tanto inactivando a la enzima PDH y la expresión de LDHA, para asegurar la eliminación del exceso de piruvato en forma de lactato (Firth, Ebert and Ratcliffe, 1995; Kim *et al.*, 2006; Papandreou *et al.*, 2006).

La delección del gen HIF-1 α en ratones es letal a estadio E11 debido a la aparición de malformaciones a nivel cardiovascular y cerebral (Iyer *et al.*, 1998; Ryan, Lo and Johnson, 1998). El KO condicional específico en progenitores neuronales causa hidrocefalia, una reducción en el número de células neuronales y problemas en la memoria espacial. Estos defectos pueden ser revertidos expresando HIF-1 α de forma exógena en estadios embrionarios (Tomita *et al.*, 2003). No obstante, la delección de HIF-1 α en neuronas maduras mediante la construcción CaMKII-CRE no causa defectos evidentes a nivel morfológico (Helton *et al.*, 2005). En ratones KO para el complejo esclerosis tuberosa (TSC, por sus siglas en inglés), uno de las principales quinasas implicadas en la inhibición de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTORC1, por sus siglas en inglés), la activación de HIF-1 α , inducida por mTORC1, incrementaba tanto la complejidad como la longitud de las dendritas de neuronas del bulbo olfatorio (Zhang *et al.*, 2016).

5.2.5 La glucosa y las patologías del sistema nervioso.

Tras todo lo expuesto en los apartados anteriores no queda ninguna duda sobre el hecho de que la homeostasis de la glucosa es esencial para el correcto desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso. Por lo tanto, cualquier problema a nivel del transporte como del metabolismo de la glucosa en el sistema nervioso se traducirá en la aparición de problemas en su correcto desarrollo y funcionamiento.

Numerosos estudios han relacionado cambios críticos en el metabolismo de la glucosa tanto con enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington o en la esclerosis lateral amiotrófica (Morea *et al.*, 2017; Solís-Maldonado *et al.*, 2018; Tefera and Borges, 2018), con epilepsia (Govil-Dalela *et al.*, 2018), o incluso con trastornos psiquiátricos como el estrés postraumático o la depresión (Li *et al.*, 2015; Zanirati *et al.*, 2018; Mellon *et al.*, 2019). El papel de la glucosa durante el desarrollo cerebral es fundamental. La deficiencia en GLUT1 es un síndrome causado por mutaciones en el gen que codifica para este transportador que conllevan problemas en el transporte de glucosa al cerebro. Esta patología se caracteriza por un retraso en el desarrollo cerebral, microcefalia y epilepsia (Leen *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2017). En niños con epilepsia se ha descrito una relación entre la frecuencia de los episodios y el tamaño de las áreas del cerebro con un metabolismo de la glucosa reducido (Govil-Dalela *et al.*, 2018).

Durante el envejecimiento se reduce el consumo de glucosa en el cerebro, sobretodo la destinada a la glucólisis (Shen *et al.*, 2012; Goyal *et al.*, 2017). Esta reducción podría relacionarse con una reducción en el proceso eliminación y formación de espinas sinápticas, implicado en el aprendizaje y la memoria a largo plazo. Diferentes estudios han señalado que en los ratones adultos las sinapsis son más estables, ya que el proceso de creación y eliminación de espinas es

menos dinámico que en ratones postnatales. Esa observación se ha relacionado con una mayor dificultad para el aprendizaje y con la existencia de antiguos recuerdos en ratones adultos (Holtmaat *et al.*, 2005; Zuo *et al.*, 2005; Yang, Pan and Gan, 2009). Por otro lado, ha sido ampliamente relacionada con diferentes enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (De Pablo-Fernández *et al.*, 2017; Butterfield and Halliwell, 2019), ya que la reducción en el consumo de glucosa implica una reducción en la cantidad de glucosa destinada a la PPP, que juega un papel clave en la protección contra el estrés oxidativo (Bolaños and Almeida, 2010; Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2012; Rodriguez-Rodriguez, Almeida and Bolaños, 2013).

En pacientes con Parkinson se ha observado una reducción en el consumo de glucosa durante las primeras fases del desarrollo de la enfermedad, durante la aparición de los primeros síntomas de demencia (Edison *et al.*, 2013). A partir del análisis de la expresión génica de muestras de pacientes de Parkinson se llevó a cabo la predicción de los flujos metabólicos correspondientes y se observó una reducción en el flujo glicolítico (Supandi and van Beek, 2018).

En el caso de la enfermedad de Alzheimer, se ha relacionado la reducción en el consumo de glucosa a nivel glicolítico durante las primeras fases de la enfermedad con una mayor acumulación de proteína tau en las regiones más vulnerables del cerebro (Vlassenko *et al.*, 2018). De hecho, la diabetes tipo 2, caracterizada por problemas en el transporte de glucosa en sangre, se ha caracterizado como un importante factor de riesgo en el desarrollo de Alzheimer (Arnold *et al.*, 2018). Incluso se ha llegado a considerar a la enfermedad de Alzheimer como la diabetes de tipo 3 (De La Monte and Wands, 2008). El alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (apoE4) es uno de los mayores factores de riesgo para el desarrollo de Alzheimer. En cultivos primarios de neuronas se ha comprobado que apoE4 puede interaccionar con el receptor de insulina y atraparlo en endosomas, alterando la señalización por insulina y como consecuencia al metabolismo de la glucosa (Zhao *et al.*, 2017).

5.3 El transporte mitocondrial en el axón.

La actividad sináptica requiere una gran cantidad de energía en forma de ATP. Tal como se resume en la Figura 12, esta energía se destina a procesos tales como el transporte y la liberación de las vesículas sinápticas o al mantenimiento de los gradientes iónicos (Harris, Jolivet and Attwell, 2012). El ATP consumido en la sinapsis proviene tanto de la glucólisis como de la fosforilación oxidativa. En condiciones de reposo, los niveles de ATP se mantienen gracias a la

actividad de la primera, sin embargo, se ha comprobado que ambas vías son necesarias para generar el volumen de ATP necesario para asegurar la transmisión del impulso nervioso (Rangaraju, Calloway and Ryan, 2014). A nivel presináptico, el ATP utilizado durante la exocitosis de las vesículas cargadas de neurotransmisores mediante las proteínas SNARE proviene tanto de la glicólisis como de la fosforilación oxidativa (Rangaraju, Calloway and Ryan, 2014). No obstante, el transporte de vesículas a lo largo del axón depende exclusivamente de la actividad glucolítica (Zala *et al.*, 2013; Hinckelmann *et al.*, 2016).

Dada la elevada longitud del axón, el abastecimiento de ATP simplemente por difusión es inviable. Es necesario, por lo tanto, sintetizarlo localmente. Por lo tanto, tanto las enzimas implicadas en la glucólisis como las mitocondrias, necesarias para llevar a cabo la fosforilación oxidativa deberán ser transportadas a lo largo del axón. El transporte de proteínas y orgánulos a lo largo del axón ha sido ampliamente estudiado (Saxton *et al.*, 2012; Millecamps and Julien, 2013; Maday *et al.*, 2014; Mandal and Drerup, 2019). Todo el mecanismo se basa en el movimiento de vesículas y orgánulos a lo largo de los microtúbulos con la ayuda de diferentes proteínas motoras. En el axón los microtúbulos se disponen de forma polarizada, con el extremo + dirigido hacia el cono axonal y el extremo – hacia el soma. El transporte dirigido hacia el extremo axonal recibe el nombre de anterógrado mientras que el dirigido hacia el soma se conoce con retrógrado.

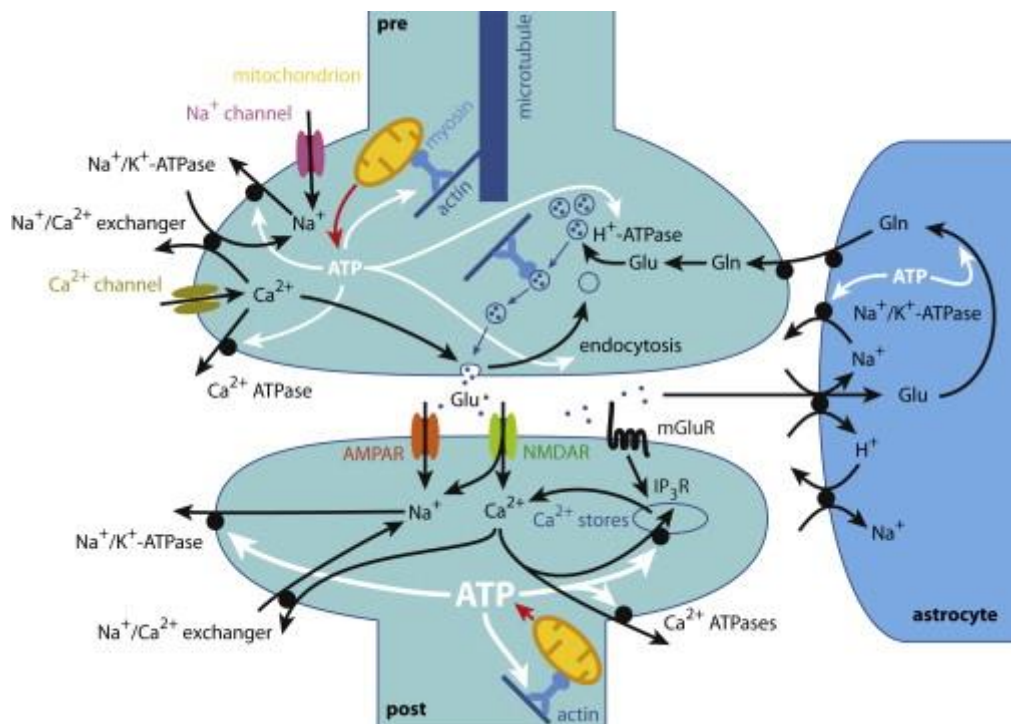


Figura 12: Mecanismos que consumen energía en la sinapsis. Entre los mecanismos implicados en la transmisión sináptica que consumen ATP destacan: las bombas ATPasas implicadas en el transporte de iones, los mecanismos de liberación de vesículas sinápticas y las proteínas motoras (dineínas, quinesina y miosina) necesarias para el transporte de vesículas y mitocondrias. Adaptada (Harris, Jolivet and Attwell, 2012).

El transporte de vesículas y orgánulos a lo largo del axón se lleva a cabo mediante proteínas motoras, que consumen energía en forma de ATP. Mientras que el transporte anterógrado es llevado a cabo por una familia de proteínas denominadas quinesinas, el retrógrado es llevado a cabo por la familia de las dineínas (Millecamps and Julien, 2013). Las proteínas motoras interactúan con las vesículas u orgánulos a transportar con la ayuda de diferentes proteínas adaptadoras (Saxton *et al.*, 2012). La primera proteína adaptadora descrita fue Milton en *Drosophila*. Sus ortólogos en mamíferos reciben el nombre de TRAK1 y TRAK2. En neuronas, Milton es necesaria para el transporte de mitocondrias a lo largo del axón hasta alcanzar el cono sináptico (Stowers *et al.*, 2002). Milton interactúa, por un lado, con la proteína quinesina y, por el otro, con Miro, una proteína de la OMM (Lin and Sheng, 2015). Esta última, perteneciente a la familia de las Rho GTPasas de la OMM, permite tanto el transporte de neuronas a lo largo de los microtúbulos como de los filamentos de actina (López-Doménech *et al.*, 2018). Miro, al igual que Milton, también es necesaria para el transporte de mitocondrias hasta la sinapsis (Guo *et al.*, 2005). Está implicada tanto en el transporte anterógrado como retrógrado (Birsá *et al.*, 2013). La delección de la isoforma Miro1 en ratones reduce tanto al transporte de mitocondrias a lo largo de axones y dendritas como la complejidad de la morfología neuronal (López-Doménech *et al.*, 2016). El transporte de las mitocondrias es por lo tanto esencial para asegurar la generación de la energía y la síntesis de determinados metabolitos esenciales para asegurar el crecimiento y mantenimiento tanto de dendritas como de axones.

Entre las diferentes proteínas adaptadoras se encuentra la proteína rica en ácido glutámico localizada en la mitocondria (MGARP, por sus siglas en inglés). MGARP es una proteína mitocondrial anclada por su dominio transmembrana a la membrana mitocondrial interna (IMS, por sus siglas en inglés), capaz de interactuar con otra proteína mitocondrial, Miro, que su a su vez es capaz de interactuar con Milton, una proteína adaptadora que finalmente interactúa con una proteína transportadora como las quinesinas (Y. Li *et al.*, 2009; Saxton *et al.*, 2012). En condiciones de hipoxia, el factor de transcripción HIF-1 α activa la expresión de esta proteína. Ha sido descrito que, en estas condiciones, tanto la delección de HIF-1 α como la de MGARP reduce el número de mitocondrias presentes a lo largo del axón y el porcentaje de mitocondrias que se desplazan en sentido anterógrado al mismo tiempo que incrementa el porcentaje las que se desplazan en sentido retrógrado (Y. Li *et al.*, 2009). Por lo tanto, MGARP juega un papel clave en la regulación del transporte anterógrado de las mitocondrias en condiciones de hipoxia. Por otro lado se ha comprobado que esta proteína también está implicada en el transporte de colesterol hasta la mitocondria (Jinn *et al.*, 2015; Baba *et al.*, 2018).

5.4 Los peroxisomas en el sistema nervioso.

Los peroxisomas son orgánulos encargados de llevar a cabo diferentes reacciones esenciales para el correcto funcionamiento celular relacionadas tanto con el metabolismo lipídico como con la prevención del daño oxidativo. En el microscopio electrónico se observan como pequeños orgánulos muy electrodensos formados por una única membrana (Smith and Aitchison, 2013). Tanto el crecimiento como el mantenimiento de los peroxisomas es llevado a cabo por una serie de proteínas conocidas como peroxinas. En mamíferos se han descrito hasta un total de 31 peroxinas diferentes codificadas por los genes PEX (Smith and Aitchison, 2013). Entre estas últimas encontramos proteínas implicadas en la translocación de proteínas en el peroxisoma, como Pex5 y Pex13, o implicadas en la elongación y la fisión del peroxisoma, como Pex11a y Pex11b (Wanders and Waterham, 2006). El primero de estos dos procesos se resume en la Figura 13.

En los peroxisomas tiene lugar un gran número de reacciones enzimáticas indispensables para el metabolismo celular (Figura 14). Entre estas reacciones destaca la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, la α -oxidación de los ácidos grasos ramificados o la síntesis de los éterfosfolípidos (Lodhi and Semenkovich, 2014). Aunque generalmente la oxidación de ácidos grasos tiene lugar en la mitocondria, los peroxisomas llevan a cabo partes de este proceso que la mitocondria es incapaz de realizar. Uno de estos procesos es la β -oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga (mayor a 22 átomos de carbono). Los problemas en el funcionamiento de estos orgánulos tiene como consecuencia la acumulación de estos ácidos grasos en la sangre (Brown *et al.*, 1982; Poulos *et al.*, 1986). Los ácidos grasos ramificados son en primer lugar oxidados mediante el proceso conocido como α -oxidación. Este proceso consiste en la eliminación del único carbono situado al extremo carboxilo. Como en el caso anterior en pacientes con problemas en el funcionamiento de peroxisomas se observó una marcada acumulación de ácidos grasos ramificados en la sangre (Wanders *et al.*, 2001). Las enzimas implicadas en la oxidación de ácidos grasos en peroxisomas y mitocondrias son diferentes. En cuanto al transporte, en mitocondrias el transporte se lleva a cabo mediante el sistema transportador de carnitina, caracterizado por la conjugación de los acil-CoA con esta molécula. Sin embargo, en el peroxisoma, este transporte es llevado a cabo mediante tres proteínas de la subfamilia de transportadores D con lugar de unión a ATP: ABCD1, ABCD2 y ABCD3 (Lodhi and Semenkovich, 2014).

Los lípidos éter son esenciales para la formación de membranas celulares. Se caracterizan debido a que los ácidos grasos en la posición 1 en lugar de interaccionar con el esqueleto de glicerol mediante un enlace éster lo hacen mediante un enlace éter. El ácido graso en la posición 2 se une igualmente con un enlace éster. Se ha comprobado que las moléculas de acetil-CoA

obtenidas de la β -oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma son principalmente destinadas a la síntesis de lípidos éter (Hayashi and Oohashi, 1995).

Los lípidos éter constituyen aproximadamente el 20% del total de fosfolípidos en humanos, siendo especialmente abundantes en el cerebro, el corazón y en los leucocitos (Lodhi and Semenkovich, 2014). Su presencia en fosfolípidos puede variar las propiedades fisicoquímicas de la membrana, incrementando la permeabilidad de la misma y facilitando la fusión entre estas. También se cree que podrían jugar un papel clave en la señalización celular, ya que forman parte de los microdominios ricos en colesterol de las membranas celulares (Lodhi and Semenkovich, 2014). En el sistema nervioso son esenciales para la síntesis de la mielina por los oligodendrocitos (Berger *et al.*, 2016).

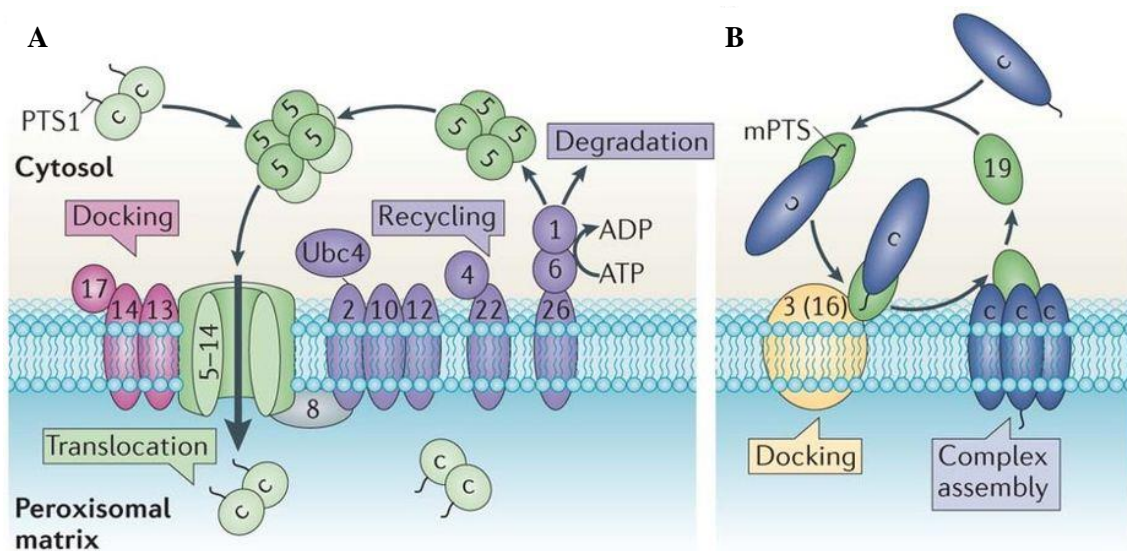


Figura 13: Mecanismo de importación de proteínas en el peroxisoma. A) Las proteínas con la señal de localización al peroxisoma PTS1 interactúan con el receptor Pex5. Este receptor, soluble en el citoplasma, interactúa a continuación con todo un complejo de transporte (colar rosa) y es integrado en la membrana para formar junto a Pex14 un canal a través del cual se introduce la proteína a transportar. Tras este proceso Pex5 es ubiquitinizada y degradada. B) Translocación de proteínas en la membrana del peroxisoma. Las proteínas con la señal mPTS interactúan con el receptor Pex19 en el citoplasma que a continuación regula su incorporación en la membrana del peroxisoma. Adaptado (Smith and Aitchison, 2013).

Los peroxisomas pueden variar su estructura y sus características en función del tejido. Los peroxisomas presentes en el sistema nervioso se caracterizan por tener un menor tamaño que los peroxisomas presentes en el resto de tejidos. Por este motivo son conocidos como microperoxisomas (Berger *et al.*, 2016). La abundancia de los peroxisomas varía tanto en función de la región del cerebro como en función del estadio del desarrollo. En la edad adulta son bastante más abundantes en las células de la médula espinal que en las del cerebro o cerebelo. A pesar de que en la mayoría de las regiones son más abundantes durante el desarrollo postnatal que durante

la adulta, es en el cerebelo donde se observa una mayor diferencia, llegando incluso a observarse, durante el primer periodo, un mayor número de peroxisomas que en la médula espinal. Las células de Purkinje, características del cerebelo, presentan un gran número de peroxisomas durante la fase de desarrollo de su árbol dendrítico que al llegar a la edad adulta se reduce hasta ser prácticamente indetectable (Arnold and Holtzman, 1978; Houdou *et al.*, 1991). En el cerebro de roedores los niveles de expresión de diferentes de diferentes proteínas del peroxisoma como ACOX1, una enzima de la β -oxidación, ABCD2, un transportador de ácidos grasos de cadena larga, o de algunas enzimas implicadas en la síntesis de fosfolípidos se incrementan tras el nacimiento, alcanzando su máximo de expresión durante las primeras semanas del desarrollo postnatal. Tras este periodo sus niveles se reducen (Berger *et al.*, 1999; Knoll *et al.*, 1999; HUYGHE *et al.*, 2001). Esta observación puede llevar a pensar que los peroxisomas juegan un papel clave en el desarrollo neuronal, ya que es durante este periodo es cuando el cerebro experimenta el mayor nivel de crecimiento en dendritas y axones (Silbereis *et al.*, 2016).

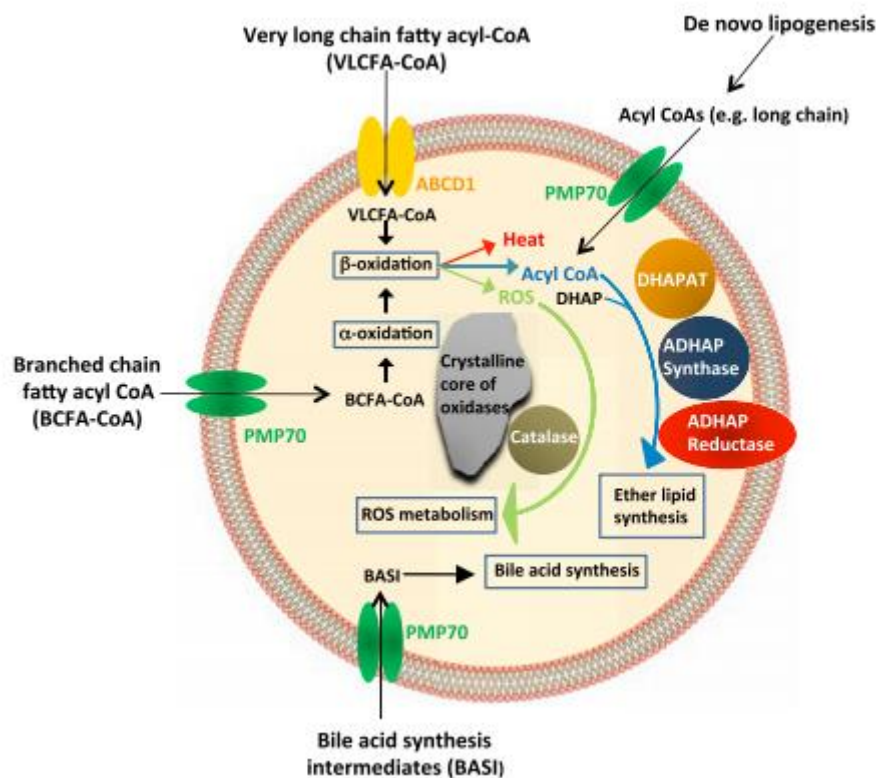


Figura 14: Estructura y función de los peroxisomas. Los peroxisomas son orgánulos formados por una membrana sencilla. Entre sus funciones destaca la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, la α -oxidación de los ácidos grasos ramificados o la síntesis de los éter-fosfolípidos o la eliminación de ROS. Adaptada (Lodhi and Semenkovich, 2014).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos, kits y equipos.

En las siguientes tablas se enumeran los diferentes reactivos, materiales y equipos utilizados a lo largo de este trabajo:

Tabla 2: Medios de cultivo comerciales

Producto	Abreviatura	Casa Comercial	Referencia
OptiMEM I	OptiMEM	Gibco	31985-047
Neurobasal A Medium 1x	NBA	Gibco	10888-022
Minimum Essential Medium	MEM	Gibco	21090-022
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM	Lonza	BE12-914F
Hanks' Balanced Salt Solution	HBSS	Gibco	14025-050

Tabla 3: Suplementos de medio de cultivo

Producto	Abreviatura	[Stock]	Casa comercial	Referencia
Suero Fetal Bovino	FBS	100%	Lab Clinic	A15-101
Penicilina/Estreptomicina	P/E	10.000U/ml - 10.000µg/ml	Lonza	DE17602F
L-Glutamina	L-Gln	200mM	Lonza	17905C
HEPES		1M	Lonza	BE13-737
Piruvato sódico	Pyr	100mM	Lonza	BE13-115
Solución Insulina-Transferrina-Selenio-Etanolamina	ITS	100X	Gibco	51500-056
Suplemento B-27	B-27	50X	Gibco	17504-044-100ML
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	7,5%	Sigma	S8761 -500ML
Glucosa		2,5M (45%)	Sigma	G8769 -100ML
Rojo Fenol	RF	0,5%	Sigma	P0290 -100ML
Arabinósido de citosina	AraC	0.24M	Sigma	C6645-100MG
Ácido quinurénico	K	10mM	Sigma	K3375-1G

Tabla 4: Medios de cultivo utilizados

Medio de cultivo	Abreviatura	Composición
Medio NBA	NBA (1%)	NBA, 1% FBS, 50U/ml P/E, 1mM L-Gln, 1X B-27
Solución SGG	SGG	Para 1L: 22,8ml NaCl 5M, 29,2ml KCl 3M, 1,764ml KCl 3M, 0,502ml MgCl ₂ 2M, 2ml CaCl ₂ 1M, 10ml Hepes 1M, 1ml Glicina 1M, 12ml Glucosa 2,5M, 5ml Pyr 0,1M, 2ml RF 0,5%
Medio bajo soporte trófico	TM _O	Para 200ml: 178ml SGG, 20ml MEM, 1ml P/E
Medio de transfección	TM _{ITS}	Para 200ml: 176ml SGG, 20ml MEM, 1ml P/E, 3ml ITS
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
Medio DMEM 10% FBS	DMEM 10%FBS	DMEM, 10% FBS, 100U/ml P/E, 2mM L-Gln, 1X B-27

Tabla 5: Soluciones tampón

Solución	Abreviatura	Composición
Tampón fosfato salino de Dulbecco 1X	D-PBS	NaCl 0,1M, KCl 2,6M, KH ₂ PO ₄ 1,4M, Na ₂ HPO ₄ 8mM, pH=7,4
Tampón fosfato (1M)	PB	K ₂ HPO ₄ 1M, NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O 1M
Tampón Tris-Acetato-EDTA 50X	TAE	Trizma base 2M, ácido bórico 1M, EDTA 50mM
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		Para 2l: 60,56g Tris, 288,26g Glicina, H ₂ O hasta 2l
Tampón de lavado Western blot	PBS-Tween	PBS 1X, TWEEN® 20 0,5%
Tampón de purificación AAVs		NaCl 150mM, Tris 20mM, pH 8,0
Tampón de fijación PFA 3% con sacarosa		PBS 1X, PFA 3%, Sacarosa 4%
Solución de bloqueo con BSA		PBS 1X, BSA 3%
Tampón de extracción de proteína		HEPES 50mM, NaCl 150mM, MgCl 1,5mM, EDTA 1mM, Triton X-100, 1:200 <i>Proteinase inhibitor Cocktail Set III</i> , 1:200 <i>Phosphatase inhibitor Cocktail II y III</i> , M-132 10μM
Tampón de lisis (Acetil-CoA/CoA)		Tris pH 7,5 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1%, 1:200 <i>Proteinase inhibitor Cocktail Set III</i> , 1:200 <i>Phosphatase inhibitor Cocktail II y III</i>
Tampón de lisis (Acetil-CoA citoplasma)		Sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM pH 7,4, EGTA 1 mM, 1:200 <i>Proteinase inhibitor Cocktail Set III</i> , 1:200 <i>Phosphatase inhibitor Cocktail II y III</i>
Tampón de fijación PFA 4%	PFA 4%	Para 1l: 250ml PFA 16% y 750ml PB 0,1M pH 7,2-7,3
Solución de crioprotección		40% PB 0,1M, 30% etilenglicol, 30% glicerol
Solución de bloqueo con FBS		10% FBS, 0,2% gelatina, 0,02% azida, 0,3% Tritón X-100, 1:300 fragmento F(ab') ₂ anti-ratón IgG
Solución de inactivación de peroxidasas		PBS 1X H ₂ O ₂ 3%, metanol 10%

Tabla 6: Enzimas

Enzima	[Stock]	Casa Comercial	Referencia
Papaína	≥16 U/mg proteína	Sigma	P3125-100MG
T4 DNA Ligase		Promega	M1801
Benzonase® Nuclease		Sigma	E1014-5KU
L-Lactate Dehydrogenase from rabbit muscle		Sigma	10127230001
Tripsina-EDTA	0,2g/l-0,5g/l	Sigma	T3924
HindIII	10u/μl	Promega	R6045
EcoRV	10u/μl	Promega	R6355
BamHI	10u/μl	NEB	R0136

Tabla 7: Kits

Nombre	Casa Comercial	Referencia
BCA protein Assay Kit	Pierce	23227
Superscript™ III First-Strand Synthesis SuperMix	Invitrogen	11752-50
PureLink™ RNA Mini Kit	Invitrogen	12183025
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega	A6002
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega	A9282
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems™	4337454
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Pierce	23227
EZ-ECL Kit	Biological Industries	20-500-120
ATPlite Luminescence Assay System	PerkinElmer	6016943
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega	E2920
Coenzyme A (CoA) Assay Kit	Sigma	MAK034
Acetyl-Coenzyme A Assay Kit	Sigma	MAK039
VECTASTAIN® Elite® ABC HRP Kit	Vector Laboratories	PK-6100
TSA Plus Cyanine 3 System	Perkin Elmer	NEL744001KT
FD Rapid GolgiStain™ Kit	FD Neurotechnologies	PK401A
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen	12643
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12663
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma	PLN70

Tabla 8: Otros reactivos y productos

Producto	Abreviatura	[Stock]	Casa Comercial	Referencia
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
GoTaq® G2 Green Master Mix			Promega	M7822
Bromuro de etidio		400μg/ml	Sigma	E8751
1kb DNA Ladder			Promega	G571A

Agarosa			Sigma	A2576
Lipofectamine™ 2000			Invitrogen	11668019
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Spectra BR		Thermo Scientific™	26634
Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution	Acrilamida	30%	Sigma	A3574-100ML
Ammonium persulfate	APS	10%	Sigma	A3678-25G
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	TEMED		Sigma	T9281-100ML
Membrana Immobilon-P, PVDF	PVDF		Merck	IPVH00010
TWEEN® 20			Sigma	P1379-500ML
Carestream® BioMax® light film			Kodac	Z373508-50EA
ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution, 10x	ReBlot Solution	10X	Sigma	2502
HiTrap® Heparin High Performance			Sigma	GE17-0406-01
Sodium deoxycholate monohydrate			Sigma	D5670-5G
Bovine Serum Albumin	BSA		Sigma	A2153-100G
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		48mM	Sigma	N1511-250MG
VECTASHIELD Antifade Mounting Medium			Vector laboratories	H-1200
CellLytic™ M			Sigma	C2978
Nonidet-P40			Fluka	74385
Dimethyl sulfoxide	DMSO		Sigma	D2650-100ML
PFKFB3 Inhibitor, 3PO - Calbiochem	3PO	50mM	Merck	525330-25MG
(Z)-4-Hydroxytamoxifen	Tmx	12,5mM	Sigma	H7904-5MG
Protease Inhibitor Cocktail Set III		200X	Merck	539134
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II		200X	Sigma	524625-1SET
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set III		200X	Sigma	524627-1ML
TriPure Isolation Reagent	Trizol		Merck	11667165001
Bicuculline	Bic	50mM	Sigma	14340-25MG
4-Aminopyridine	4-AP	250mM	Sigma	275875-5G
2-deoxyglucose	2-DG		Sigma	D8375
Cycloheximide	CHX	10mM	Sigma	C7698
Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone	CCCP	1µM	Sigma	C2759
Sodium oxamate	Oxam		Sigma	O2751
Forskolin	FSK	10mM	Sigma	F6886-10MG
(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid	TROLOX	100mM	Sigma	238813-5G
Paraformaldehyde	PFA		Sigma	P6146-1KG
Glucose, D- [U-14C]-			Perkin Elmer	NEC042V250UC
L-[3,4-3H(N)]-Glutamine, >97%, 250µCi (9.25MBq)			Perkin Elmer	NET551250UC
Tissue-Tek* O.C.T. Compound	OCT		Tissue-Tek	4583
Superfrost Plus™ Adhesion Microscope Slides			Thermo Scientific™	J1800AMNT
Super PAP Pen			Invitrogen	8899

AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG			Jackson ImmunoResearch	AB_2338467
3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate	DAB		Sigma	D5637-5G
Eukitt® Quick-hardening mounting medium	Eukitt		Sigma	3989
Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium	Fluoromount		Sigma	F4680
BisBenzimide trihydrochloride H33342	Hoescht	1mM	Sigma	14533
2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose	2-NBDG		Life Technologies	N13195
Image-iT™ Red Hypoxia Reagent			Life Technologies	H10498
Fluo-4, AM, cell permeant	Fluo-4		Life Technologies	F14201
Hidrobromuro de Poli-D-Lisina	PL	1mg/ml	Sigma	P6407
Laminina		1mg/ml	Sigma	L2020
Recombinant Human/Murine/Rat BDNF	BDNF	5µg/ml	PreproTech	450-02
Recombinant Human IGF-I	IGF-1	100µg/ml	PreproTech	100-11
Filtros PES 0,22µm 500ml			Biofil	FPE204500
Filtros PES 0,22µm 1L			Sigma	FPE204500
Filtros Millex-GP 0,22µm			Merck	SLGP033RS
Filtros Millex-GV 0,22µm			Merck	SLGV033RS

Tabla 9: 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
Diagenode Bioruptor,	Liege
Criostato Leica CM1900	Leica
Homogeneizador (tipo <i>tight-fitting glass-Teflon homogenizer</i>)	
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
Regulador de volumen de gas para hipoxia	Stem Cell Technologies
Microscopio óptico Axiovert 40 C	Zeiss
Microscopio de fluorescencia	Olympus BX61/BX62
Microscopio Confocal Zeiss LSM 880	Zeiss

Tabla 10: Primers

Secuencia 5' - 3'	Orientación	Gen	Especie	Uso
GCC CAC CTG CGG ATC AGC AC	F	HIF-1 α	Ratón	Genotipado
AAA AGT ATT GTG TTG GGG CAG T	R	HIF-1 α	Ratón	Genotipado
AGA GGA TCC TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT	F	HIF-1 α	Humano	Clonage HIF-DN
AAG CGG ATA TCT AAT TCA CAC ATA CAA TGC ACT G	R	HIF-1 α	Humano	Clonage HIF-DN
AAG CGG ATA TCT AAT TCA CAC ATA CAA TGC ACTG	F	Glut3	Rata	qPCR
GCT CCA ATC GTG GCA TAG AT	R	Glut3	Rata	qPCR
CCA GCA GAA CAG CCT AGA CC	F	HK2	Rata	qPCR
AGA TGC CTT GAA TCC CTT TG	R	HK2	Rata	qPCR
CTG GGA GAG CGT GTC CAT	F	PFK1	Rata	qPCR
CAT CGG GCA CTT CCA ATC	R	PFK1	Rata	qPCR
ACA ATG AGG AGG CCA TGA GA	F	PFKFB3	Rata	qPCR
CTT TGT CAG GTA GCT TTT GAC G	R	PFKFB3	Rata	qPCR
GCC GCC TGG ACA TTG ACT C	F	PKM	Rata	qPCR
CCA TGA GAG AAA TTC AGC CGA	R	PKM	Rata	qPCR
ATG CCG CCA GAA GTT GAG	F	Siah2	Rata	qPCR
GTA TGG TGT AGA GTC AGG GAA CAG	R	Siah2	Rata	qPCR
AAC AGG ATG GAA TGG AGC AG	F	HIF-1 α	Rata	qPCR
TGG TCA GCT GTG GTA ATC CA	R	HIF-1 α	Rata	qPCR
AGT ACA TGC ACC GCT TTG CT	F	GPI	Rata	qPCR
ACT TTC CAT TGG ATT CCA TGT C	R	GPI	Rata	qPCR
TCT CCG CCC ACA GAG ATG AG	F	Siah1	Rata	qPCR
GTT GGA TGC AGT TGT GCC AG	R	Siah1	Rata	qPCR
GTG GAG CGA TTT GTC TGG TT	F	18S	Rata	qPCR
CAA GCT TAT GAC CCG CAC TT	R	18S	Rata	qPCR
AGG CGG AGT TAC AAC CACT T	F	MGARP	Rata	qPCR
TCT CCA GTC TCT GAA CAC GC	R	MGARP	Rata	qPCR
TGT CCG GAG AAA CAG CCA A	F	PKM1	Rata	qPCR
GTG GAT TGA CTG GAG GCT CG	R	PKM1	Rata	qPCR
TGT CCG GAG AAA CAG CCA A	F	PKM2	Rata	qPCR
CAA GTG GTA GAT GGC AGC CT	R	PKM2	Rata	qPCR
GAC CGA CTG GTC CCA AGA AT	F	PEX5	Rata	qPCR
CGA TGT GCC CTC AGA GTT AGC	R	PEX5	Rata	qPCR
AGG AGA TGC TAA TGG CGA CG	F	ACOT8	Rata	qPCR
CCC ACA ATC TGA CCC CCA AA	R	ACOT8	Rata	qPCR
CCG GCG ACT AAT CTG ATC CC	F	PEX11a	Rata	qPCR
GCC TCT TTG CCA GCC TTA GA	R	PEX11a	Rata	qPCR
ATT TCA GGC TGC TAT CGG GG	F	ABCD2	Rata	qPCR
CCA ACT GTT CAA AGC GCC AA	R	ABCD2	Rata	qPCR
TCA CCT GAA GGA CCC TGA CA	F	Catalase	Rata	qPCR
TCC ATC TGG AAT CCC TCG GT	R	Catalase	Rata	qPCR
AAG TGA AGG AAC TGT GGC CT	F	PEX13	Rata	qPCR
CAT GGT CGT CCT CAC CGT TT	R	PEX13	Rata	qPCR

Tabla 11: Plásmidos

Nombre	Origen	Referencia	Resistencia	Descripción
pFΔ6	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)
AAV-shGPI	Creación propia		Ampicilina	small hairpin RNA contra GPI (AAV)
AAV-shACLY	Creación propia		Ampicilina	small hairpin RNA contra ACly (AAV)
AAV-shSiah2	Creación propia		Ampicilina	small hairpin RNA contra Siah2 (AAV)
AAV-shSiah2 (2)	Creación propia		Ampicilina	small hairpin RNA contra Siah2 (AAV)
AAV-DNHIF	Creación propia		Ampicilina	Dominante negativo de HIF-1α (AAV)
AAV-GFP	Hilmar Bading	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)	Ampicilina	Proteína GFP (AAV)
AAV-ACREB	Hilmar Bading	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)	Ampicilina	Dominante negativo de CREB (AAV)
pCDNA3-HA-HIF-1α	H. Frankling Bunn	(Huang <i>et al.</i> , 1998)	Ampicilina	Proteína HIF-1α humana con tag HA
Siah2	Addgene #122041		Ampicilina	Proteína Siah2
mitoRED	Antonio Zorzano	(Legros <i>et al.</i> , 2002)	Ampicilina	Marcaje con RFP de mitocondrias
GFP	Creación propia		Kanamicina	Proteína GFP
Globina	Creación propia		Ampicilina	Proteína globina. Usada como control
ICER	Giles Hardingham	(Hasel <i>et al.</i> , 2017)	Ampicilina	Proteína ICER. Inhibidor CREB.
HRE-luciferase	Addgene #26731	(Emerling <i>et al.</i> , 2008)	Ampicilina	Luciferasa bajo el promotor HRE
CRE-luciferase	Giles Hardingham	(Papadia <i>et al.</i> , 2005)	Ampicilina	Luciferasa bajo el promotor CRE
MRE-luciferase	Eric Olson		Ampicilina	Luciferasa bajo el promotor MRE
ODD-Luciferase-pCDNA3	Addgene #18965	(Safran <i>et al.</i> , 2006)	Ampicilina	Luciferasa fusionada con ODDD
Luciferase-pCDNA3	Addgene #18964	(Safran <i>et al.</i> , 2006)	Ampicilina	Luciferasa bajo el promotor CMV
TK-Renilla	Giles Hardingham	(Papadia <i>et al.</i> , 2005)	Ampicilina	Renilla bajo el promotor TK
CMV-Renilla	Giles Hardingham		Ampicilina	Renilla bajo el promotor CMV

Tabla 12: Secuencias shRNAs

Nombre	Especie	Gen	Secuencia 5' - 3'
AAV-shGPI	Rata	GPI	ACA GAG AAA CCA GAG CAT GAA
AAV-shACLY	Rata	ACLY	GCA AGC AAG CAG AGA ACT TTG
AAV-shSiah2	Rata	Siah2	GGA TTA CTC CAA GAA CCT TGT
AAV-shSiah2 (2)	Rata	Siah2	GCA TCA AGC CTG GAT GCT TTA

Tabla 13: siRNAs

Nombre	Especie	Gen	Casa Comercial	Referencia
ON-TARGETplus Non-targeting Pool	Rata	control	Dharmacon	D-001810-10
siGENOME Rat Slc2a3 siRNA - SMARTpool	Rata	Glut3	Dharmacon	D-090091-01
siGENOME Rat Siah2 siRNA - SMARTpool	Rata	Siah2	Dharmacon	L-089773-02
siGENOME Rat ACLY siRNA - SMARTpool	Rata	ACLY	Dharmacon	M-098529-01

Tabla 14: Anticuerpos

Nombre	Especie	Concentración	Técnica	Casa comercial	Referencia
α GFP	Conejo	1:750	ICF	Invitrogen	A11122
α Actina	Ratón	1:10000	WB	Sigma	A4700
α Siah2	Cabra	1:350	WB	Santa Cruz	sc-5507
α PKM1/2	Conejo	1:750	WB	Cell Signalling	3190
α Glut3	Conejo	1:750	WB	Abcam	ab191071
α HK2	Cabra	1:500	WB	Santa Cruz	sc-6521
α PFKFB3	Conejo	1:1000	WB	Cell Signalling	13123
α FIH-1	Ratón	1:500	WB	Santa Cruz	sc-271780
α PHD1	Conejo	1:1000	WB	Abcam	ab113077
α PHD2	Ratón	1:200	WB	Santa Cruz	sc-271835
α PHD3	Conejo	1:1000	WB	Novus Biologicals	NB100-139SS
α HIF-1 α	Conejo	1:2000	WB/IHF/IHC	Abcam	ab179483
α HIF-2 α	Conejo	1:1000	WB	Abcam	ab179825
α OGDH	Conejo	1:500	WB	Sigma	HPA020347
α DLST	Conejo	1:250	WB	Sigma	HPA003010
α FASN	Ratón	1:500	WB	Santa Cruz	sc-48357
α ACLY	Conejo	1:1000	WB	Cell Signaling	4332
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/IHC/IHF	Jackson ImmunoResearch	715-065-150
Biotin SP-conjugated α Rabbit	Burro	1:200	ICF/IHC/IHF	Jackson ImmunoResearch	715-065-152
α Mouse-HRP	Cabra	1:5000	WB	Sigma	A4416
CyTM3-conjugated Streptavidin		1:500	ICF/IHC/IHF	Jackson ImmunoResearch	016-160-084
A488-conjugated Streptavidin		1:500	ICF/IHC/IHF	Jackson ImmunoResearch	016-540-084
α Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Pollo	1:400	ICF/IHC/IHF	Invitrogen	A-21200

6.2 Modelos animales.

6.2.1 Ratas.

En la realización de este trabajo se han utilizado ratas *Sprague Dawley*. Los animales se han obtenido de la Unidad de Experimentación Animal (UEA) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Tanto el mantenimiento como la manipulación de los animales han sido llevados a cabo por técnicos del animalario.

6.2.1.1 Administración de 3PO a ratas postnatales a día ocho (P8):

A las crías de rata en estadio P8 se les administró diariamente una dosis de 50mg/Kg del inhibidor de PFKFB3, 3PO, o DMSO, usado como control, mediante inyección peritoneal durante cinco días seguidos. Seis horas tras la última inyección, las crías fueron sacrificadas por decapitación y sus cerebros fueron extraídos para llevar a cabo el análisis de la morfología neuronal mediante la tinción de Golgi.

6.2.2 Ratones.

En la realización de este trabajo se han utilizado dos cepas diferentes de ratones. La cepa de ratones CD-1 IGS, para comparar entre ratones postnatales y adultos, y una cepa de ratones transgénicos, para llevar a cabo la delección del gen de HIF-1 α durante el desarrollo postnatal.

6.2.2.1 Ratones CD-1 IGS:

Los ratones de esta cepa se han obtenido de la Unidad de Experimentación Animal (UEA) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Tanto el mantenimiento como la manipulación de los animales ha sido realizado por técnicos del animalario.

6.2.2.2 Ratones KO para HIF-1 α :

Para estudiar el papel *in vivo* de HIF-1 α en el desarrollo de la arquitectura neuronal se utilizó una cepa de ratones previamente desarrollada en el laboratorio del Dr. Julián Aragonés de la Universidad Autónoma de Madrid (Soro-Arnaiz *et al.*, 2016). En el genoma de estos ratones las dos copias del gen HIF-1 α se encuentran flanqueadas por dos secuencias *loxP* y una copia de la CRE recombinasa inducible por tamoxifeno, cuya expresión está regulada por un promotor ubicuo (UBC-CRE-ERT2). Por lo tanto, estos ratones expresan de forma ubicua la CRE recombinasa, lo que permite la inactivación global de HIF-1 α tras el tratamiento con tamoxifeno.

La administración del tamoxifeno a los ratones neonatos se llevó a través de la leche materna. Entre los 3 y 5 días tras dar a la luz, a la madre se le administró por inyección intraperitoneal 2mg de tamoxifeno al día durante un período de 5 días. Los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en la UEM de la Universidad Autónoma de Madrid. Cuando alcanzaron la edad adulta (4-6 meses) fueron transferidos a la UEA de la facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona para finalmente llevar a cabo el análisis de su estructura neuronal.

6.2.3 Genotipado.

Para confirmar si tras la administración de tamoxifeno, el gen HIF-1 α ha sido o no eliminado se lleva a cabo la genotipación de los diferentes ratones a partir del tejido extraído de la punta de sus colas.

6.2.3.1 Aislamiento de DNA:

1. Se añaden 0,5ml de NaOH 50mM directamente sobre el tejido y se incuba durante 5 minutos a 100 °C.
2. Se disgrega el tejido con la ayuda de una pipeta y se incuba durante 5 minutos más a 100 °C.
3. Se añaden 60 μ l de Tris-HCl 1M pH 6,8 y se incuba durante 5 minutos a 100 °C.
4. Se centrifuga durante 15 minutos a 16000g para precipitar los restos de tejido.
5. Se transfiere el sobrenadante, con el DNA disuelto, a un tubo nuevo.

6.2.3.2 Reacción de PCR:

1. Se prepara la mezcla de reacción teniendo en cuenta un volumen final de 25 μ l:

Componente	Cantidad
DNA	1 μ l
Forward primer 10 μ M	1 μ l
Reverse primer 10 μ M	1 μ l
GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	12,5 μ l
Agua libre de Nucleasas	9,5 μ l

2. Se introducen las muestras en el termociclador y se inicia el programa indicado a continuación:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2min
10	94 °C	20s
	65-60,5 °C*	15s
	72 °C	10s
28	94 °C	20s
	60 °C	15s
	72 °C	10s
1	72 °C	2min
	4 °C	-

* En cada ciclo se reduce la temperatura 0,5 °C.

3. Se prepara un gel de agarosa al 1% (Sección 6.6.4), se cargan las muestras junto a un marcador de peso molecular y se corre durante 30 minutos a 100V.
4. Se observa el resultado con la ayuda de un transiluminador de luz UV.

6.3 Cultivos primarios de neuronas corticales de embriones de rata.

Los cultivos primarios de neuronas corticales se han llevado a cabo siguiendo un protocolo preestablecido en el laboratorio de Giles Hardingham (Soriano *et al.*, 2008). Han sido utilizados embriones de rata en estadios entre 19,5 y 21,5 de ratas *Sprague Dawley*. Los animales se han obtenido de la Unidad de Experimentación Animal (UEA) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Tanto el mantenimiento como la manipulación de los animales han sido realizados por técnicos del animalario. El cruce de ambos animales se ha llevado a cabo durante un período de tres días.

El proceso de aislamiento y el de mantenimiento de los cultivos neuronales se lleva a cabo en condiciones de esterilidad, en las campanas de flujo laminar de clase II previamente esterilizadas con UV y etanol 70%. Los medios y soluciones utilizadas durante el proceso se han esterilizado previamente por filtración o mediante autoclavado. El material quirúrgico utilizado se lava y desinfecta con etanol 70% antes de su utilización.

6.3.1 Preparación de medios utilizados.

En la obtención y mantenimiento de cultivos de neuronas corticales se utilizan los medios descritos en la Tabla 4. Al medio NBA se le añade directamente a la botella de medio el FBS, el

suplemento B-27, el P/E y la L-Gln. Para la preparación de los medios SGG y DM se mezclan los volúmenes indicados en la Tabla 4 y a continuación se esteriliza mediante un filtro de vacío con poros de 0,22 μ m de diámetro. Antes de su utilización, tanto el TM_O como el TM_{ITS} se mantienen en la incubadora para equilibrar el pH y mantenerlos a 37 °C.

6.3.2 Preparación del *coating*.

Es necesario realizar un recubrimiento con poli-D-lisina (PL) y laminina de las placas para permitir la adhesión de las neuronas a la superficie de la misma. La PL es un polímero de aminoácidos sintetizado químicamente que permite la adhesión de las neuronas a una superficie de plástico o cristal. La laminina es una glicoproteína de la matriz extracelular que promueve la adhesión y el crecimiento de las células neuronales. Todo el proceso se realiza en la campana de flujo laminar tal como se ha descrito previamente:

1. Se descongelan las alícuotas de PL y laminina en un baño a 37 °C. Ambas se utilizan a una concentración de 1mg/ml.
2. Se atempera el agua Mili-Q en un baño a 37 °C.
3. Se calcula el volumen necesario de solución de *coating*. En una placa de 24 pocillos se utilizarán 0.5ml por cada pocillo. Mientras que en placas de 6 pocillos o placas de 35mm se utilizarán 2ml por pocillo.
4. Se mezclan las cantidades requeridas de PL, laminina y agua Mili-Q. Por cada 75ml de solución se necesita 1mg de PL y 0,35mg de laminina.
5. Se añade la cantidad necesaria a cada placa. Las placas se incuban durante un mínimo de dos horas en la incubadora a 37 °C y un 5% de CO₂.
6. Tras la incubación de las placas, se aspira la solución de *coating* y se realiza un lavado con agua Mili-Q estéril. Finalmente se dejan secar las placas con la tapa medio abierta en el interior de la campana de flujo laminar.

6.3.3 Preparación de la solución de disección.

La solución de disección (DM) se utiliza para transportar los embriones desde el animalario hasta el laboratorio y para realizar la disección de las cortezas cerebrales. También es necesaria para preparar la solución enzimática utilizada en la disgregación. Todo el proceso se lleva a cabo en la campana de flujo laminar. Para la preparación de 40ml de esta solución se mezcla en 36ml de medio DM con 4ml de solución K (Tabla 4). Finalmente se ajusta el pH añadiendo NaOH 50mM hasta tornar la solución de un color rosáceo. Se añaden de 100 en 100 μ l (generalmente 500 μ l suelen ser suficientes). La solución se mantiene a temperatura ambiente hasta su utilización.

El ácido quinurénico (K) es un antagonista no selectivo de los receptores de NMDA, AMPA y kainato. Su utilización en la solución de disección permite prevenir la muerte neuronal por excitotoxicidad. La solución de K 10mM se prepara en la cabina de flujo laminar:

1. Para obtener 80ml de solución, en un tubo cónico de 50ml se pesan 158,56mg de K.
2. Se añaden 5ml de H₂O Mili-Q estéril, 0,4ml de rojo fenol y por último 0,4ml de Hepes pH 7,4.
3. Se añade NaOH 1N de 100 en 100 μ l y se mezcla mediante un agitador vórtex hasta que todo el K quede disuelto y el medio adquiera un color rosáceo. Normalmente son requeridos 500 μ l.
4. Se añaden 4ml de MgCl₂ y se mezcla mediante un agitado vórtex.
5. Se pasa toda la solución a una botella de vidrio de 250ml y se añade H₂O hasta alcanzar los 80ml.
6. Se filtra mediante un filtro *Millex-GP* de 0,22 μ m.
7. Se preparan alícuotas de 4ml que se mantienen a -20 °C hasta su uso.

6.3.4 Preparación de la solución de papaína.

Para la disgregación enzimática del tejido se utiliza la enzima papaína. Se utiliza esta enzima dado que es menos agresiva y dañina que la tripsina. Para la preparación de 50ml de solución enzimática, en una cabina de flujo laminar:

1. Se añaden 22,5mg de L-cisteína en una botella de vidrio de 250ml.
2. Se añaden 5ml de K y 45ml de DM.
3. Se corrige el pH añadiendo NaOH 0,2M hasta que la solución se vuelve de un color rosáceo (Normalmente se necesitan entre 300 o 800 μ l).
4. Se añaden 500U de papaína.
5. Para disolver correctamente la papaína se introduce la botella en el baño a 37 °C durante dos minutos y a continuación se mezcla la solución mediante un agitador vórtex. Se repite este proceso hasta que la papaína queda completamente disuelta.
6. Se filtra la solución enzimática mediante un filtro *Millex-GV* de 0,22 μ m de baja retención de proteínas.
7. Se preparan alícuotas de 4ml que se mantienen a -20 °C hasta su uso.
8. Antes de utilizarla se descongela la alícuota de enzima en un baño a 37 °C.

6.3.5 Extracción y disección de las cortezas cerebrales de embriones de rata.

Los animales se sacrifican por asfixia mediante CO₂ en el animalario de la UEA. La muerte del animal se confirma por ausencia del reflejo corneal o de respuesta a un estímulo presión-dolor. Inmediatamente tras confirmar la muerte, en el laboratorio del animalario se extraen los embriones, en estadio 19,5-21,5, se sacrifican por decapitación y se guardan en medio DM. A continuación, se transportan rápidamente al laboratorio donde se procederá a la extracción de los hemisferios cerebrales. Antes de proceder con la disección de las cortezas cerebrales, se descongela la enzima en el baño a 37 °C. Todo el proceso se lleva a cabo en condiciones de esterilidad, en la cabina de flujo laminar:

1. Se extraen los hemisferios de cada embrión y se depositan en una placa con solución de disección. El número de hemisferios utilizados se calcula en función del número de placas de cultivo necesarias para los diferentes experimentos programados. En una placa de 24 pocillos se siembran 0,5ml por cada uno, mientras que en una placa de seis se siembran 2,5ml. Por cada 13ml sembrados se requiere una corteza. Las cortezas se disgregarán en 10ml y se añadirá medio optiMEM hasta obtener el volumen necesario para sembrar todas las placas.
2. Con la ayuda de una lupa binocular se extrae el *corpus callosum*, el hipocampo y las meninges.
3. Con la ayuda de una pipeta de 10ml se traspasan las cortezas en la solución de disección a un tubo de plástico con la base redondeada. Con la misma pipeta se intenta eliminar tanta solución de disección como sea posible.
4. Se añade al tubo con las cortezas 2ml de solución la solución enzimática previamente descongelada e incubada a 37 °C. Se incuba a 37 °C durante 20 minutos. Es importante agitar cada 5 minutos el tubo con las cortezas para asegurar la disgregación del tejido. Transcurrido este período de tiempo se aspira la solución enzimática y se añaden 2ml más de papaína. Se deja incubando a 37 °C durante 20 minutos más. Durante este período de tiempo se puede proceder al lavado del *coating*.
5. Tras los 20 minutos de la segunda incubación se elimina toda la solución enzimática posible y se llevan a cabo dos lavados con 2 ml de DM y dos lavados con 2 ml de medio NBA (1%). En cada lavado el tubo se rota en posición horizontal para asegurar la completa eliminación de la enzima de las paredes del tubo.
6. Se retira el último lavado y se añaden 2ml más de NBA (1%). A continuación, con la ayuda de una pipeta de 2ml se pipetea arriba y debajo de forma rápida unas 50-60 veces con el objetivo de llevar a cabo la disgregación mecánica del tejido.
7. Se añaden 2ml 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 de espera se aspira con

mucho cuidado el medio sin tocar los restos de tejido del fondo del tubo y se pasa a un tubo cónico de 15ml.

8. Se repite el paso anterior dos veces más. Tras la tercera y última disgregación no se añaden 2ml extra, tan solo se deja sedimentar los restos de tejido no disgregado.
7. Los 10ml de NBA (1%) con las neuronas disgregadas se transfieren a una botella estéril con el volumen de optiMEM necesario, previamente atemperado a 37 °C, y se siembran las placas previamente preparadas con el *coating*. En una placa de 24 pocillos se utilizarán 0.5ml por cada pocillo. Mientras que en placas de 6 pocillos o en placas de 35mm se utilizarán 3ml por pocillo.
9. Se mantienen durante 2,5 horas en la incubadora de cultivos a 37 °C y un 5% de CO₂.
10. Pasado este período de tiempo, las neuronas se habrán adherido al *coating*, se substituye el medio de siembra optiMEM por medio de crecimiento NBA (1%) (para placas de 24 pocillos 1ml mientras que en placas de 6 pocillos 2ml), previamente atemperado a 37 °C, 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 1 ml de medio NBA (1%) a cada pocillo de una placa de 24 (en placas de 6 se retiran 0,5ml y se añaden 1,5ml). Paralelamente se realiza un tratamiento con AraC. Este fármaco bloquea la replicación del DNA, evitando la proliferación de las células gliales. El AraC se añade junto con el NBA (1%) fresco a una concentración final de 1,2mM.
12. Tras 4 días de incubación, a DIV7-9, se cambia el medio por TM_O o TM_{ITS} en función de la clase de experimento (estimulación/transfección). Los 8-9 días de crecimiento son esenciales para nuestros experimentos dado que durante este período de tiempo las neuronas se desarrollan, expresan los diferentes receptores sinápticos y establecen las diferentes conexiones sinápticas.

6.3.6 Obtención de cultivos de células gliales.

Para la realización de los cultivos de células gliales la solución de recubrimiento se prepara sin laminina. Se parte de las células disgregadas en medio optiMEM del apartado anterior:

1. Se lleva a cabo una dilución 1:2 del disgregado celular en medio optiMEM suplementado con glucosa.
2. Se siembran las células en las placas correspondientes, teniendo en cuenta los volúmenes indicados en el apartado anterior.
3. Se mantienen durante 2,5 horas en la incubadora de cultivos a 37 °C y un 5% de CO₂.
4. Pasado este período de tiempo, las células se habrán adherido al *coating*, se substituye el medio de siembra optiMEM por medio DMEM con FBS al 10% y se dejan crecer los

cultivos en la incubadora de cultivos a 37 °C y un 5% de CO₂. El medio se cambia cuando se observa una marcada acidificación del mismo.

5. Pasada una semana se llevan a cabo los experimentos deseados.

6.3.7 Estimulación de la actividad sináptica.

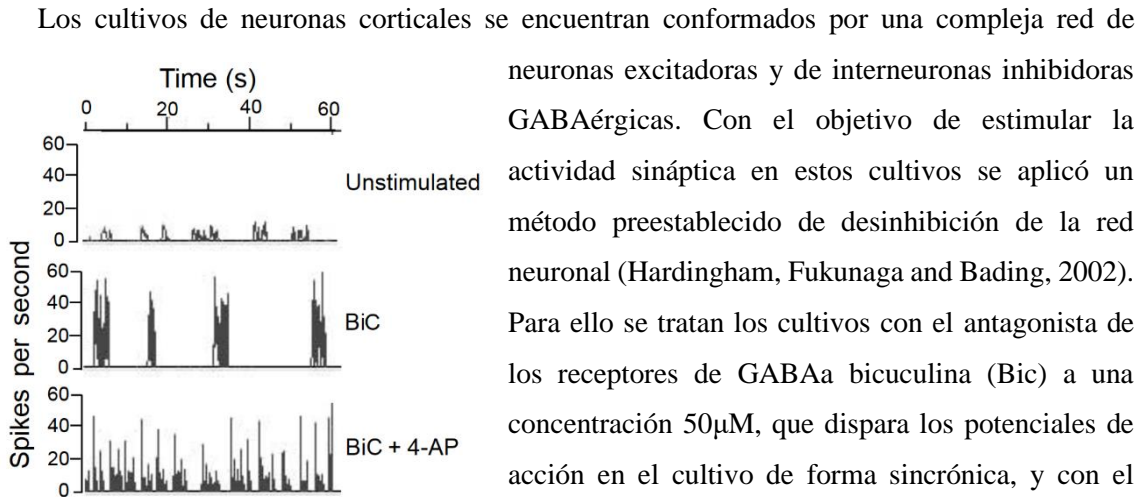


Figura 15: El tratamiento combinado con Bic y 4-AP estimula la generación y la frecuencia de los potenciales de acción en cultivos de neuronas corticales. La actividad sináptica se analizó teniendo en cuenta los cambios en la concentración de Ca²⁺ intracelular. Figura adaptada (Hardingham, Fukunaga and Bading, 2002)

neuronas excitadoras y de interneuronas inhibitoras GABAérgicas. Con el objetivo de estimular la actividad sináptica en estos cultivos se aplicó un método preestablecido de desinhibición de la red neuronal (Hardingham, Fukunaga and Bading, 2002). Para ello se tratan los cultivos con el antagonista de los receptores de GABA_A bicuculina (Bic) a una concentración 50µM, que dispara los potenciales de acción en el cultivo de forma sincrónica, y con el bloqueador de los canales de K⁺ 4-aminopiridina (4-AP) a una concentración de 250µM, que incrementa la frecuencia de los potenciales de acción (Figura 15).

Como se ha comentado previamente los experimentos se llevaban a cabo transcurridos entre siete y 9 días en cultivo, con el objetivo que durante este período de tiempo las neuronas se desarrollaran y empezaran a expresar los diferentes receptores sinápticos. Dos horas antes de llevar a cabo la estimulación de los cultivos, se cambiaba el medio de cultivo por TMO.

6.4 Cultivos de líneas celulares.

La manipulación de líneas celulares se ha llevado a cabo en condiciones de esterilidad. Toda la manipulación de los cultivos se ha realizado en cabinas de flujo laminar vertical. Antes de su encendido las cabinas se han descontaminado mediante radiación UV. Antes de trabajar se ha descontaminado la superficie con etanol 70%. Todo el material y los medios utilizados han sido descontaminados previamente mediante autoclave o por esterilización.

6.4.1 Línea celular.

La línea celular utilizada es la Hek293. Se trata de células aisladas de riñón de embrión humano transformadas con DNA del adenovirus 5(Graham *et al.*, 1977). A lo largo de este trabajo esta línea se ha utilizado principalmente para la producción de adenovirus recombinantes.

6.4.2 Manipulación.

6.4.2.1 Descongelación:

Las líneas celulares se mantienen congeladas en nitrógeno líquido hasta su utilización. Por ello antes de sembrarlas es necesario descongelarlas. La descongelación se realiza de forma rápida, ya que las células se congelan en presencia de DMSO, utilizado como crio-protector, que a temperatura ambiente es tóxico:

1. Se descongela el crio-tubo introduciéndolo en un baño a 37 °C.
2. Se añaden 12ml de medio DMEM 10% FBS atemperado a un frasco T-75.
3. Cuando se ha descongelado prácticamente toda la suspensión celular, se pasa todo el volumen del crio-tubo al frasco T-75 con 6ml de medio.
4. Se deja incubar durante 3 horas a 37 °C y un 5% de CO₂.
5. Se cambia el medio por 12ml de DMEM 10% FBS atemperado.
6. Se deja en la incubadora a 37 °C y un 5% de CO₂.

6.4.2.2 Mantenimiento:

El cultivo debe mantenerse en división, evitando la confluencia completa, ya que esto puede afectar a la viabilidad celular. Para evitar esto, cada 2-3 días se lleva a cabo el pase de células de un recipiente de cultivo a otro por tripsinización. Para frascos T-75:

7. Se aspira completamente el medio de cultivo.
8. Se realiza un lavado con 10ml de PBS1X estéril previamente atemperado a 37 °C.
9. Se añaden 2ml de tripsina.
10. Se agita vigorosamente el frasco y se deja en la incubadora a 37 °C durante 2 minutos mientras la tripsina actúa. Se puede comprobar si las células se han desenganchado de la superficie mirándolas al microscopio. Es importante no prolongar demasiado el tiempo de incubación de las células con tripsina dado que esta también degrada receptores de la superficie celular y puede comprometer la viabilidad de las células.
11. Se añaden 10ml de medio DMEM 10%FBS al frasco para diluir la tripsina e inhibir su actividad.

12. Con la ayuda de una cámara de Neubauer se cuantifica el número de células por mililitro y se calcula el volumen necesario para sembrar el número de células necesario.
13. Se siembra el volumen necesario de células en la nueva placa y se añade DMEM 10% FBS hasta 12ml.
14. Se deja de nuevo en la incubadora a 37 °C y un 5% de CO₂.

6.4.2.3 Congelación:

Las líneas celulares pueden mantenerse durante largas temporadas congeladas en nitrógeno líquido. Para cada línea se guarda, como stock, diferentes crio-tubos con células con un bajo número de pases. Para congelar un cultivo celular en un frasco T-75:

1. Se prepara en hielo 6ml de medio de congelación, FBS con DMSO al 10% (5,4ml de FBS y 0,6ml DMSO).
2. Se tripsinizan las células tal como se ha descrito en el apartado anterior y la suspensión resultante se centrifuga a 800g durante 5 minutos.
3. Se descarta el sobrenadante.
4. Se resuspende el pellet en la solución de congelación preparada previamente. A partir de aquí se mantiene la suspensión celular en hielo debido a que el DMSO es citotóxico a temperatura ambiente.
5. Se reparte la suspensión en diferentes crio-tubos (1,2ml por tubo).
6. Se congela a -80 °C.
7. Al día siguiente se congela definitivamente en nitrógeno líquido.

6.5 Análisis de la expresión génica.

Los niveles de expresión génica se han determinado por PCR cuantitativa (qPCR). Esta variante de la PCR convencional permite determinar a tiempo real la cantidad de una determinada secuencia de DNA de doble cadena. La reacción se lleva a cabo en presencia de una sonda fluorescente capaz de unirse al DNA de doble cadena. A medida que la DNA polimerasa va amplificando la secuencia de DNA objetivo la sonda va uniéndose a las nuevas moléculas sintetizadas. Como resultado se da 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.

6.5.1 Aislamiento de RNA a partir de tejido.

Para confirmar que los ratones KO para HIF-1 α no expresaban su mRNA, se purificó el RNA total y se cuantificaron sus niveles por qPCR. La extracción se llevó cabo mediante el método fenol-cloroformo. En la fase inicial del proceso se utiliza el reactivo *TriPure Isolation Reagent* de Merck que consiste en una solución monofásica que contiene fenol e isocianato de guanidina. Para la extracción se partió del tejido congelado a -80 °C tal como se ha descrito en la sección 6.13.1.1. Los pasos seguidos se enumeran a continuación:

1. Se deja el tejido en hielo durante 5 minutos para que se descongele.
2. Se pesa el tejido. Se utilizan entre 75 y 150mg de tejido (Una corteza cerebral de ratón adulto).
3. Se añade al tejido 1ml del reactivo *TriPure Isolation Reagent*. Se mezcla con el agitador vórtex.
4. Se homogeneiza el tejido por pipeteo, en primer lugar, 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.
6. Se añaden 200 μ l de cloroformo. Se mezcla con el agitador vórtex.
7. Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Se centrifuga 12000g durante 15 minutos a 4 °C.
9. Se transfiere la fase acuosa (la superior) a un tubo nuevo (aproximadamente 0,5ml).
10. Se añaden 0,5ml de isopropanol frío. Se mezcla con el agitador vórtex.
11. Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
12. Se centrifuga 12000g durante 10 minutos a 4 °C.
13. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1ml de etanol 70%. Se mezcla brevemente mediante el agitador vórtex.
14. Se centrifuga a 7500g durante 5 minutos a 4 °C.
15. Se elimina el sobrenadante, dejamos los tubos abiertos y los dejamos secar a temperatura ambiente entre 15 y 30 minutos con el objetivo de que el etanol se evapore completamente.
16. Se resuspende en H₂O libre de RNAsas.
17. Se mide su concentración (ng/ μ l) mediante la placa NanoQuant (TECAN) y el lector 200 PRO (TECAN).

6.5.2 Aislamiento del RNA de cultivos neuronales.

El aislamiento de RNA se ha llevado a cabo mediante el kit comercial *PureLink™ RNA Mini Kit* de Invitrogen, basado en columnas con membrana de sílice:

1. En la campana de flujo laminar se aspira todo el medio de cultivo y, en el caso de que la extracción de RNA no se vaya a llevar a cabo inmediatamente, se añade RNAlater directamente a cada pocillo (En placas de 24 pocillos se añaden 300µl, lo suficiente para cubrir toda la superficie). A continuación, se precinta la placa con Parafilm y se deja a 4 °C. En estas condiciones la placa se puede almacenar durante unos días. En el caso de que se lleve a cabo el aislamiento en ese momento se aspira el medio y se procede al paso siguiente directamente.
2. Se aspira el RNAlater y se añade a cada pocillo *Lysis Buffer* del *PureLink™ RNA Mini Kit* con un 1% β-mercaptoetanol para homogeneizar el cultivo. El volumen total de *Lysis Buffer* por cada condición es 350µl. Repartimos este volumen entre los diferentes pocillos de una misma condición.
3. Con la ayuda de una punta de P1000 se rasca los pocillos para desadherir las células y se homogeneizan por pipeteo. Se transfiere el lisado de los diferentes pocillos de una misma condición a un tubo Eppendorf de 1,5ml.
4. Se procede con el protocolo de aislamiento del *PureLink™ RNA Mini Kit* siguiendo las instrucciones del kit.
5. Tras eluir el RNA, se mide su concentración (ng/µl) mediante la placa NanoQuant (TECAN) y el lector 200 PRO (TECAN).

6.5.3 Síntesis de cDNA.

La retro-transcripción del RNA para obtener el DNA complementario (cDNA) se realiza mediante el kit *Superscript™ III First-Strand Synthesis SuperMix*:

1. Para cada muestra, se mezclan 1000ng de RNA con 10µl de *2X RT Reaction Mix* y 1,5µl de *RT Enzyme Mix* y se añade agua libre de RNAsas hasta un volumen final de 20µl.
2. Se introducen los tubos con las reacciones en el termociclador y se ejecuta el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo
25 °C	10'
50 °C	30'
85 °C	5'
4 °C	-

6.5.4 Reacción de qPCR.

Durante la realización de este trabajo se ha utilizado el kit *GoTaq® qPCR Master Mix* de Promega. Los *primers* utilizados se muestran en la Tabla 10. Para su diseño se ha utilizado el programa *Primer-BLAST* del NCBI (Ye *et al.*, 2012). El protocolo utilizado se describe a continuación:

1. Se prepara la mezcla de reacción. Para un volumen final de 15µl:

Componente	Cantidad
cDNA	1µl
Forward primer 10µM	0,45µl
Reverse primer 10µM	0,45µl
GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	7,5µl
Agua libre de RNAsas	5,6µl

La reacción de amplificación para cada gen de cada muestra se lleva a cabo por triplicado. Se prepara en un tubo el volumen para las tres reacciones y después se reparte en tres tubos de reacción diferentes.

2. Se introducen las muestras en un termociclador *Applied Biosystems StepOnePlus™ System* y se programa tal como se indica a continuación:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	10min
40	95 °C	30s
	60 °C	40s
	72 °C	30s
1	95 °C	15s
	60 °C	1min
	95 °C	15s

En primer lugar, se incuba la muestra a 95 °C con el objetivo de activar la DNA polimerasa. A continuación, tienen lugar los 40 ciclos de amplificación del DNA. El último ciclo se corresponde con el análisis de la curva de fusión (*melting curve analysis*) del DNA. Este análisis permite determinar el nivel de especificidad de los *primers* utilizados.

3. A partir de las curvas de amplificación, se obtienen los valores de umbral de ciclo (*threshold cycle; Ct*) con el programa *StepOnePlus™ software V2.1* de *Applied Biosystems*. El valor *Ct* es el ciclo de amplificación a partir del cual el producto de la amplificación emite un nivel de fluorescencia detectable.

4. A partir de los valores Ct, se calcula la expresión relativa del gen ($\Delta\Delta Ct$). Como control interno se utiliza la expresión del RNA ribosomal 18S. Dado su elevado nivel de expresión, para su análisis se realiza una dilución 1:200 de las muestras de cDNA. El cálculo del $\Delta\Delta Ct$ se realiza tal como se indica a continuación:

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct(gen) - Ct(18S) \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct(cond) - \Delta Ct(C) \\ Ratio &= 2^{-\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

En primer lugar, se calcula ΔCt , para cada condición se obtiene la diferencia de expresión entre el gen de estudio y el control interno (18S). A continuación, se obtiene $\Delta\Delta Ct$, es decir, la expresión relativa del gen de estudio en una determinada condición (cond) con respecto a la muestra control (C). En el caso de la muestra control $\Delta\Delta Ct=0$. Por último, se obtiene la ratio de expresión, dado que cada ciclo de diferencia se corresponde con la existencia del doble DNA en una muestra con respecto a la otra: $Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

6.6 Técnicas generales de manipulación del DNA.

El trabajo con DNA y bacterias se ha llevado a cabo con material esterilizado por autoclave para evitar contaminaciones con DNAsas, otras bacterias o con DNA ajeno. La manipulación de bacterias se ha llevado a cabo en las proximidades de un mechero Bunsen, que nos proporciona un área estéril de trabajo. Para preparar las diferentes soluciones se ha utilizado agua Mili-Q.

6.6.1 Transformación de bacterias competentes.

La transformación bacteriana permite seleccionar los plásmidos recombinantes que nos interesan y amplificarlos a continuación. Las bacterias competentes transformadas a lo largo de este trabajo pertenecen a la cepa JM109 *Escherichia Coli* desarrollada y comercializada por Promega. La transformación se ha llevado a cabo por choque térmico tal como se indica a continuación:

1. Se añade a 40 μ l de bacterias competentes el plásmido que se quiere transformar. Generalmente se utilizan cantidades entre 10pg y 50ng diluidos en un volumen entre 1 y 10 μ l. Para productos de ligación se añade todo el volumen de la reacción de ligación (10 μ l).
2. Se mezcla y se mantiene en hielo durante 30 minutos. Durante este tiempo el plásmido se adhiere a la superficie de la bacteria.

3. Se lleva a cabo el choque térmico incubando la bacteria a 42 °C durante 1 minuto.
4. Se devuelve la bacteria al hielo durante 2 minutos.
5. Se añade 1ml de medio LB al tubo con las bacterias y se incuba durante 1 hora a 37 °C en agitación. Esta incubación permite que las bacterias que hayan incorporado el plásmido empiecen a expresar la resistencia al antibiótico. Esto permite su posterior selección.
6. Se siembran 100-200µl de bacterias transformadas en una placa de LB agar con el antibiótico deseado. El cultivo también puede concentrarse por centrifugación a 1000g durante 4 minutos.
7. Se incuba la placa durante 24 horas a 37 °C.
8. Pasado este período de incubación se toman una o varias colonias y se crecen en medio LB líquido.

Las bacterias transformadas se mantienen a -80 °C en glicerol (850µl cultivo bacteriano+150µl glicerol).

6.6.2 Recuperación de DNA plasmídico.

El aislamiento de los plásmidos a partir de los cultivos bacterianos se ha llevado a cabo mediante kits comerciales. En función de la cantidad de DNA necesaria se ha llevado a cabo: *minipreps* (0,1-0,2µg/µl) para obtener pequeñas cantidades destinadas a la caracterización del plásmido o *midipreps* (0,3-0,5µg/µl) y *maxipreps* (1-1,2µg/µl) para cantidades superiores destinadas a la transfección de células eucariotas o la generación de virus.

6.6.2.1 MiniPrep:

Se ha utilizado el *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* de Sigma. Se ha seguido el protocolo indicado en el kit.

6.6.2.2 MidiPrep y MaxiPrep:

Para las MidiPreps se ha utilizado *HiSpeed Plasmid Midi Kit* y para las MaxiPreps el *HiSpeed Plasmid Midi Kit*, ambos de Qiagen. Se ha seguido el protocolo indicado en el kit.

6.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa.

La PCR consiste en la obtención de múltiples copias de una determinada secuencia de DNA. La enzima utilizada es una DNA polimerasa termoestable, la Taq DNA polimerasa. Esta enzima

es capaz de sintetizar la cadena complementaria de una determinada cadena de DNA molde. A lo largo de este trabajo se ha utilizado la *GoTaq® G2 Green Master Mix* de Promega que contiene los diferentes elementos necesarios para realizar una reacción de PCR (DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂...). Dado que la DNA polimerasa requiere una secuencia previa a partir de la cual empezar a añadir nucleótidos es necesario la utilización de dos fragmentos de DNA cebador o *primers*. Estas secuencias, complementarias a cada una de las hebras de DNA, delimitan, por lo tanto, el fragmento de DNA que se quiere amplificar. Los *primers* utilizados se detallan en la Tabla 10.

Para un volumen de reacción de 25µl:

Componente	Cantidad
Gotaq Green MM 2X	12,5µl
Agua libre de DNAsas	9,5µl
Forward primer 10µM	1µl
Reverse primer 10µM	1µl
DNA	1µl

El programa de amplificación introducido en el termociclador se muestra a continuación:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	5min
30	94 °C	30s
	55 °C *	40s
	72 °C	30s
1	72 °C	5min
	4 °C	-

*Esta es la fase de alineamiento de los *primers* con el DNA. La temperatura a la que se lleva a cabo puede variar en función de la temperatura de fusión (T_m) de los *primers*.

6.6.4 Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica básica para la separación de fragmentos de DNA en función de su tamaño. El DNA se carga en un gel de agarosa. Tras aplicar una corriente eléctrica, el DNA, cargado negativamente, se mueve hacia el polo positivo. En función de su tamaño, los fragmentos de DNA pasaran con mayor o menor dificultad entre los poros del gel. El tamaño de los poros viene determinado por la concentración de agarosa utilizada para preparar el gel. A lo largo de este trabajo se han utilizado en la mayoría de los casos geles a una concentración de agarosa del 1% (p/v). Estos geles tienen una buena resolución para la separación de fragmentos

de entre 400 y 6000 pb. Para separar fragmentos de mayor tamaño se utilizará una menor concentración (0,5-0,8%) y para fragmentos de menor tamaño (1,2-2%). A lo largo de este trabajo se ha trabajado con dos tamaños de geles, de 50 o de 100ml, en función del sistema de electroforesis utilizado. El protocolo utilizado se describe a continuación:

1. Para un gel de 50ml, se pesa la cantidad de agarosa necesaria (para un gel al 1%, 0,5g), y se mezcla con 50ml de TAE 1X en un Erlenmeyer de 150ml. La solución se calienta en un microondas sin que llegue a hervir para disolver completamente la agarosa.
2. Se prepara el soporte para la polimerización del gel con el molde con el número de pozos necesarios.
3. Cuando la agarosa ha quedado completamente disuelta, se deja enfriar la solución, hasta aproximadamente 40 °C (cuando el recipiente se puede sujetar sin quemarse) y se añade el bromuro de etidio, a una concentración final de 16ng/ml. Se mezcla bien y se vierte sobre el soporte.
4. Cuando el gel ha polimerizado completamente se coloca en la cubeta de electroforesis y se cubre completamente con TAE 1X.
5. Antes de cargar las muestras en el gel, se mezclan con el tampón de carga 6X (concentración final 1X). Se cargan entre 10 y 25µl en cada pocillo.
6. Se prepara el marcador de peso molecular. Para 12µl de volumen final de marcador se utilizan: 1µl de *DNA ladder* de Promega, 9µl de H₂O libre de DNAsas y 2 µl de tampón de carga.
7. Tras cargar el marcador y las diferentes muestras, se conectan los electrodos a la fuente de electroforesis y se corre el gel a un voltaje de 100V.
8. Tras un período de aproximadamente 20 minutos, se detiene la fuente de alimentación y se comprueba el resultado en un transiluminador de rayos UV.

6.6.4.1 Recuperación de fragmentos de DNA de geles de agarosa:

Para recuperar un determinado fragmento de DNA de un gel de agarosa se ha utilizado el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* de Promega siguiendo las instrucciones incluidas en el mismo. A la hora de visualizar y recortar la banda en el transiluminador hay que evitar una exposición prolongada a los rayos UV para evitar posibles daños en el DNA.

6.6.5 Clonación.

La clonación de DNA consiste en la inserción de una secuencia génica en un plásmido con el objetivo de obtener múltiples copias de ella. La estrategia más común es el clonaje de productos de PCR.

6.6.5.1 Diseño de *primers* y PCR:

Los *primers* utilizados para amplificar y clonar una determinada secuencia génica están conformados por:

- Secuencia de hibridación: Región del *primer* complementaria con la secuencia a amplificar (18-21pb).
- Diana de restricción: Secuencia reconocida por la enzima de restricción utilizada en el clonaje (6-8 pb).
- Secuencia cabecera: nucleótidos extra añadidos al principio del primer para facilitar la digestión de la secuencia amplificada por la enzima de restricción (3- 6pb).

A la hora de seleccionar las dianas de restricción debemos tener en cuenta las dianas de restricción existentes en el plásmido donde clonaremos la secuencia génica. Preferiblemente utilizaremos enzimas que generen extremos cohesivos ya que esto facilita la ligación. La PCR de amplificación se lleva a cabo tal como se ha descrito en la Sección 6.6.3.

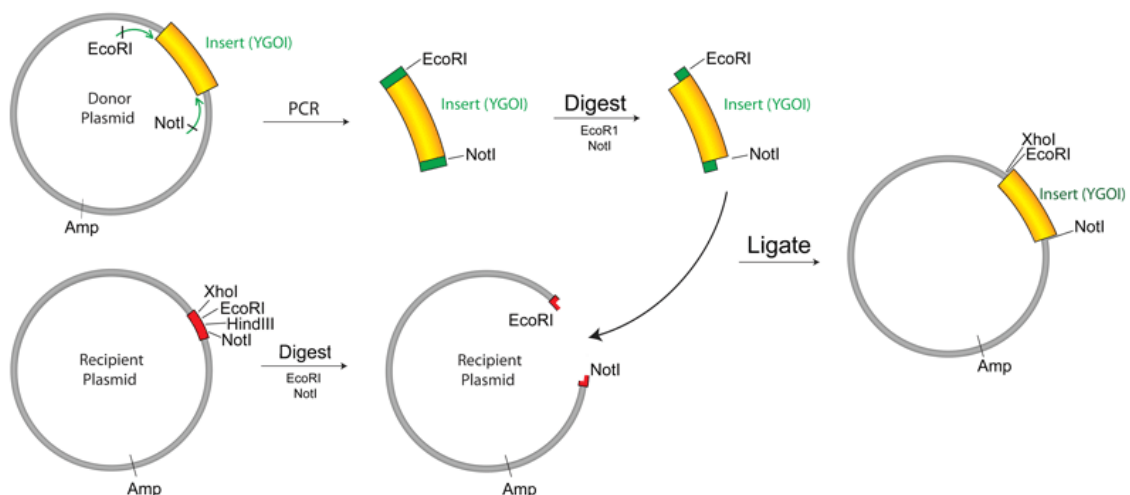


Figura 16: Ejemplo gráfico de clonaje por PCR. En este ejemplo se utilizan las enzimas de restricción EcoRI y NotI. Ambas generan extremos cohesivos. Los *primers* utilizados contienen las secuencias diana de estas enzimas de restricción. Esquema adaptado de www.addgene.org.

6.6.5.2 Aislamiento:

Se corre el producto de la PCR en un gel de agarosa y se aísla tal y como se ha indicado en la Sección 6.6.4. La banda se eluye en un total de 50µl de agua libre de DNAsas.

6.6.5.3 Digestión:

Para facilitar la posterior ligación, el inserto y el vector de clonaje se digieren con las mismas enzimas. Preferiblemente dos enzimas de restricción diferentes que generen extremos cohesivos. Cada enzima tiene un tampón de reacción óptimo. En el caso de utilizar dos enzimas diferentes se utiliza el tampón en el que la actividad de ambas enzimas sea mayor. Generalmente se ha utilizado 1U de enzima por reacción. No obstante, en el caso de llevar a cabo la reacción en presencia de un tampón en el que la actividad de enzima no fuese la óptima se ha ajustado la cantidad, llegando a utilizar entre 1,5 y 2U de enzima. Hay que tener en cuenta que la cantidad de enzima no puede superar el 10% del volumen de reacción. Esto se debe al hecho de que la enzima está disuelta en glicerol, y a concentraciones superiores al 10% este solvente es capaz de inhibir la reacción enzimática. La digestión se lleva a cabo durante un período de 1 hora a una temperatura de 37 °C.

La digestión del inserto lleva a cabo en un volumen final de 50µl, ya que se digiere prácticamente todo el volumen de inserto. La digestión del plásmido se lleva a cabo también en un volumen final de 50µl. Se difiere 1µg de plásmido. Los volúmenes utilizados se detallan a continuación:

Componente	Cantidad
Inserto	41-43µl
Enzima de restricción 1	1-2µl
Enzima de restricción 2	1-2µl
Tampón	5µl
Agua libre de DNAsas	hasta 50µl

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

Finalmente se purifica el DNA digerido mediante el el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* de Promega.

6.6.5.4 Ligación

Por último, se lleva a cabo el proceso de ligación, es decir, la unión del plásmido y el inserto. Para ello se utiliza ligasa del bacteriófago T4, comercializada por Promega. El protocolo seguido es el siguiente:

1. Se prepara la mezcla de reacción. Se procura que la cantidad de inserto sea mayor que la de vector. Para un volumen de reacción de 10 μ l:

Componente	Cantidad
Inserto	7 μ l
Plásmido digerido	1 μ l
Tampón 10X	1 μ l
T4 DNA ligasa	1 μ l

2. Se incuba durante toda la noche a 4 °C.
3. El producto de ligación se transforma en bacterias competentes.
4. Se crecen las bacterias transformadas y se realiza una *MiniPrep* para aislar el plásmido obtenido.
5. Se analiza el plásmido resultante por restricción. Este paso es fundamental ya que el plásmido podría haber religado consigo mismo tras la ligación.
6. Se secuencian para comprobar que el clonaje ha funcionado correctamente (tal como se describe en las siguientes secciones).

6.6.6 Análisis del DNA por restricción.

Para comprobar si un clonaje ha funcionado correctamente se puede analizar un plásmido por restricción. Esta técnica consiste en digerir un plásmido con una determinada enzima de restricción de forma que se obtiene una serie de fragmentos únicos para este plásmido. En el caso de un clonaje se suele escoger una enzima con una diana en el plásmido y otra en el fragmento clonado. Tras correr el resultado en un gel de agarosa, si el clonaje ha funcionado se observan dos bandas diferentes y si no ha funcionado tan solo se observa una banda. La digestión del DNA se ha llevado a cabo tal como se ha descrito en la *Sección 6.6.5.3*.

6.6.7 Secuenciación.

Para acabar de confirmar que un clonaje ha funcionado correctamente se lleva a cabo la secuenciación de la región del plásmido donde se ha ligado el fragmento clonado. La secuenciación se ha llevado a cabo en el servicio de Genómica de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona. La secuenciación se lleva a cabo mediante el

método de Sanger. Antes de llevar las muestras al servicio de Genómica las procesamos mediante el *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. También es necesario diseñar un *Primer* que determine el principio de la región que se desea amplificar. Los pasos previos a la secuenciación se describen a continuación:

1. Se prepara la mezcla de reacción. Para 20µl de volumen final:

Componente	Cantidad
DNA 100ng (1000pb)	X µl
<i>Primer</i> 5µM	1 µl
Enzima BD3.1	1 µl
Tampón BD3.1	3 µl
Agua libre de DNAsas	hasta 20 µl

2. Se introducen los tubos en el termociclador y se ejecuta el siguiente programa:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	96 °C	5min
25	96 °C	10s
	50 °C	5s
	60 °C	4min
1	4 °C	-

3. Se envía el producto de esta reacción al servicio de Genómica de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona.

6.7 Transfección celular transitoria.

La transfección consiste en la introducción de material génico exógeno en células eucariotas. A lo largo de este trabajo se ha transfectado tanto plásmidos como RNAs de interferencia (siRNA). En el caso de que el material génico introducido no se inserte en el genoma se habla de transfección transitoria. La lista de plásmidos y siRNAs utilizados se muestra en la Tabla 11 y la Tabla 13, respectivamente.

El proceso de transfección se ha llevado a cabo mediante el reactivo comercial *Lipofectamine™ 2000* de Invitrogen. Este reactivo se constituye de una mezcla de lípidos catiónicos que en un medio acuoso forman liposomas, capaces de atrapar el material génico a

transfectar. La carga positiva de los liposomas facilita la interacción del material génico con la membrana plasmática, ya que ambos están cargados positivamente, y facilita la internalización del primero que tiene lugar por endocitosis (Thermo Fisher Scientific, 2015). En los cultivos de neuronas corticales utilizados a lo largo de este trabajo, la eficiencia en condiciones óptimas ha sido del 5%. Todo el proceso de transfección de cultivos neuronales se lleva a cabo en condiciones de esterilidad tal como se describe a continuación:

1. Mínimo 2 horas antes de llevar a cabo la transfección, se cambia el medio de NBA (1%) a TM_{ITS} . Este medio contiene ITS, un suplemento del medio de cultivo que actúa como antioxidante y favorece la viabilidad celular.
2. Se prepara la solución con el DNA a transfectar. Para una placa de 24 pocillos: se añaden 33 μ l de medio TM_{ITS} (de la propia placa) y hasta 0,7 μ g de DNA por cada pocillo a transfectar.
3. Se prepara la solución de lipofectamina. Para una placa de 24 pocillos: se añaden 33 μ l de medio TM_{ITS} (de la propia placa) y 0,35 μ l de *Lipofectamine*TM 2000 por cada pocillo a transfectar.
4. Se añaden 33 μ l por pocillo de la solución de lipofectamina a la solución de DNA. Se mezcla por pipeteo.
5. Se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Se añaden 285 μ l de medio por cada 66 μ l de solución. Se mezcla por pipeteo.
7. Se añaden 333 μ l a cada pocillo a transfectar tras aspirar completamente el medio.
8. Se mantiene durante al menos 2 horas en la incubadora de cultivos a 37 °C y un 5% de CO₂.
9. Pasado el período de incubación se substituye el medio de transfección por medio TM_{ITS} fresco y se devuelven al incubado.
10. Los experimentos se realizan 24-48h tras la transfección para que las células puedan expresar las proteínas codificadas en el DNA transfectado.

6.8 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 oxidación de luciferina a oxiluciferina y emite luminiscencia en el proceso. Al clonarla tras el promotor de estudio se puede cuantificar su nivel de actividad basándose en el nivel de actividad luciferasa presente en extractos celulares. El plásmido con la construcción promotor-luciferasa se transfecta entre 24 y 48 horas antes de llevar a cabo el

experimento. Para la detección de la actividad luciferasa se ha utilizado el kit comercial *Dual-Glo® Luciferase Assay System* de Promega. Como control de transfección, se ha utilizado la la cotransfección con la luciferasa *Renilla*. Esta enzima cataliza la conversión de coelenterazina en coelenteramida y emite luminiscencia durante el proceso. La *Renilla* se ha puesto bajo el control de los promotores de CMV o de la Timidina quinasa (TK). Se ha seguido el protocolo descrito en el kit.

6.9 Medida de los niveles de acetil-CoA y CoA.

Para analizar los niveles de acetil-CoA y CoA se utilizó los kits comerciales *Acetyl-Coenzyme A Assay Kit* y *CoA Assay Kit* de Sigma. Para el análisis se utilizó una placa de 6 pocillos por condición (alrededor de 8 millones de células). Los pasos seguidos se detallan a continuación:

1. Se lleva a cabo dos lavados del cultivo con 2ml de PBS 1X previamente atemperado.
2. Se añaden 2ml de PBS 1X con inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail Set III*) y fosfatasas (*Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II y III*).
3. Se desadhieren las células rascando cada pocillo con la ayuda de una punta azul y se transfieren a un tubo.
4. Se centrifuga la suspensión celular a 14,000g durante 10 minutos.
5. Se resuspende en 240µl de tampón de lisis.
6. Se sónica en ciclos de 30 segundos a máxima potencia y 30 segundos de reposo durante 5 minutos. En todo momento se mantiene en hielo.
7. Se centrifuga a 14000g durante 10 minutos y el sobrenadante se desproteíniza mediante los *Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters, 10K* de Merck.
8. Se lleva a cabo la medida por triplicado siguiendo las instrucciones del kit.

Para determinar los niveles citoplasmáticos de acetil-CoA, a partir de los pellets de neuronas obtenidos en el paso 4:

1. Se resuspende en 250µl del tampón de lisis (Acetil-CoA citoplasma).
2. Se homogeneizan las células mediante un homogeneizador Dounce.
3. Se centrifuga a 14000g durante 10 minutos.
4. Se centrifuga a 14000g durante 10 minutos y el sobrenadante se desproteíniza mediante los *Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters, 10K* de Merck.
5. Se lleva a cabo la medida por triplicado siguiendo las instrucciones del kit.

El resultado se normaliza dividiéndolo por el contenido total de proteína (Sección 6.12).

6.10 Análisis de la incorporación de glucosa y glutamina en lípidos.

Para llevar a cabo este análisis las neuronas se cultivan sobre cubreobjetos de vidrio en presencia de 0,8 μ Ci/ml de 14 C-U- glucosa (Perkin-Elmer) o 2 μ Ci/ml de L-3-4- 3 H(N)-glutamina (Perkin Elmer). El aislamiento de lípidos se lleva a cabo de acuerdo con un protocolo preestablecido (FOLCH, LEES and SLOANE STANLEY, 1957):

1. Se sumergen los cubreobjetos con las células en una solución de metanol y cloroformo a una relación 2:1 (vol:vol).
2. Se incuban a temperatura ambiente y en agitación durante 20 minutos.
3. Se añade la quinta parte del volumen existente de NaCl 0,154M.
4. Se centrifuga la muestra a 500g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. El 80% de la fase apolar o lipídica (fase inferior) se añade al líquido de centelleo.
6. Se cuantifica el número de desintegraciones por minuto con la ayuda de un contador de centelleo.

Los valores se normalizan por el contenido de proteína total a partir de la fase polar (Sección 6.12).

6.11 Infección con virus adeno-asociados (AAVs).

Tal como se ha comentado previamente, la eficiencia de transfección de los cultivos neuronales utilizados es muy baja, aproximadamente del 5%. Para conseguir una mayor eficiencia se ha utilizado una estrategia alternativa: la infección con virus adeno-asociados (AAVs). Los AAVs son una clase de virus no patogénicos de la familia *Parvoviridae*. Se trata de virus muy simples, incapaces de replicarse de forma autónoma, que requieren la co-infección con otro virus para poder replicarse. Los AAVs utilizados en este trabajo se han generado en el mismo laboratorio mediante el protocolo descrito a continuación.

6.11.1 Amplificación de AAVs.

Para la generación de AAVs se transfectan cultivos de la línea celular Hek293 con los siguientes plásmidos:

- pRV1: contiene las secuencias Rep y Cap del serotipo AAV2
- pH21: contiene las secuencias Rep y Cap del serotipo AAV1

- pFΔ6: contiene el plásmido auxiliar con los genes de adenovirus necesarios para la replicación del AAV.
- Plásmido AAV: 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 Tabla 12.

Todo el trabajo con líneas celulares y virus se lleva a cabo en condiciones de esterilidad en una campana de bioseguridad de clase 2B. Los pasos seguidos se describen a continuación:

1. Se siembran 5 frascos T-175 con células Hek293 24-48h antes de llevar a cabo la transfección de forma que en el momento de llevar a cabo la transfección los cultivos estén al 80% de confluencia. Las células se cultivan en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS.
2. Se prepara la solución de DNA con los diferentes plásmidos utilizados:

Para 5 T-175	
Plásmido	Cantidad
pFΔ6	143,75μg
pRV1	35,94μg
pH21	35,94μg
Plásmido AAV	71,875μg

3. Se prepara la solución de transfección. A 5ml de medio optiMEM sin suplementar se añaden 300μl de Lipofectamina 2000 (aproximadamente 1μl de Lipofectamina por cada 1μg de DNA transfectado). Se incuba la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se mezclan la solución de plásmidos y la de transfección y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Paralelamente, se lleva a cabo la tripsinización de los cultivos de células Hek293. En primer lugar, se lava cada uno de los frascos T-175 con PBS1X esterilizado y atemperado a 37 °C. A continuación, se añaden 4ml de tripsina, debidamente atemperada y activada, a cada frasco. Cuando las células se han dissociado, se añaden 16ml de optiMEM suplementado con un 10% de FBS a cada frasco, se mezcla el contenido de los 5 frascos y se añaden 16ml de la mezcla de células en 5 nuevos frascos T-175.
6. Se añaden 20ml de optiMEM suplementado con un 10% de FBS y 2ml de la mezcla de transfección a cada frasco y se incuba a 37 °C y un 5% de CO₂ durante toda la noche.

7. 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).

6.11.2 Purificación de AAVs.

La purificación de los virus se lleva a cabo mediante la lisis de los cultivos de Hek293 y la utilización de columnas *HiTrap® Heparin High Performance* de Sigma:

1. 72 horas tras la transfección se retira todo el medio y se realiza un lavado de cada frasco T-175 con 25ml de PBS1X a temperatura ambiente.
2. Se añaden 20ml de PBS1X a cada frasco, se desenganchan las células con un raspador y se recoge todo el volumen (100ml) en un mismo tubo.
3. Se centrifuga la suspensión celular a 600g durante 30 minutos.
4. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 50ml de tampón de purificación.
5. Se congela durante toda la noche a -20 °C.
6. A la mañana siguiente se descongelan los pellets a temperatura ambiente y se añade desoxicolato de sodio a una concentración final de 0,5%.
7. Se añaden la endonucleasa Benzonasa a una concentración final de 50U/ml y se mezcla completamente.
8. Se incuba en un baño de agua a 37 °C durante 1 hora.
9. Se centrifuga a 3000g durante 15 minutos a 4 °C para eliminar los restos celulares.
10. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se congela a -20 °C hasta su purificación.
11. Se conectan las columnas de heparina HiTrap a una bomba peristáltica para que las diferentes soluciones fluyan a través de la columna a un caudal de 1ml por minuto. Es muy importante asegurarse de que no se introducen burbujas de aire en la columna.
12. Se equilibra la columna con 10ml de solución de purificación.
13. Se repite el paso 9 para asegurarse de que no quedan restos celulares.
14. Se cargan los 50ml del sobrenadante en la columna.
15. Se lava la columna con 20ml de NaCl 100mM y Tris 20mM a pH 8.0 a un ritmo de 1ml por minuto.
16. Con la ayuda de jeringas de 5ml se llevan a cabo dos lavados de la columna, primero con 1ml de NaCl 200mM y Tris 20mM a pH 8,0 y a continuación con 1ml de NaCl 300mM y Tris 20mM a pH 8,0.
17. Mediante jeringas de 5ml y aplicando una presión constante, se eluye el virus cargando en la columna:
 - 1,5ml de NaCl 400mM y Tris 20mM a pH 8,0

- 3ml de NaCl 450mM y Tris 20mM a pH 8,0
 - 1,5ml de NaCl 500mM y Tris 20mM a pH 8,0
18. Se recolecta en un tubo cónico de 15ml.
 19. Se concentran las partículas víricas mediante las *Amicon ultra-4 centrifugal filter units* de Sigma, para un peso molecular de 100.000kDa. Se carga todo el volumen eluído en el paso anterior y se centrifuga a 3000g durante 3 minutos a 4 °C.
 20. Se llevan a cabo dos lavados con 3,5ml de PBS1X.
 21. Se recolecta el volumen concentrado (250µl) y se le añade 250µl de PBS1X para obtener un volumen final de virus de 500µl.
 22. Se esteriliza por filtración la solución de virus mediante un filtro *Millex-GV* de 0.22µm de Merck.
 23. Se realizan alícuotas de 30µl y se almacenan a -80 °C.

6.11.3 Protocolo de infección.

La infección de las neuronas se lleva a cabo a DIV4. La solución de virus se descongela en hielo. Para una placa de 24 pocillos, se añade 10µl por cada uno. Para ello se extrae 0,5ml de medio NBA (1%) de cada pocillo se añade el volumen necesario de virus y se devuelve 0,5ml a los diferentes pocillos. Los experimentos se llevan a cabo tras 4 o 5 días de la infección.

6.12 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se ha realizado mediante el *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*.

6.13 Western blot.

El *Western blot* es una técnica básica en bioquímica para la separación e identificación de proteínas mediante un anticuerpo específico. Consiste en la separación de proteínas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), seguida por la transferencia de las proteínas, separadas por peso molecular, a una membrana de PVDF para la posterior detección de la proteína de interés mediante un anticuerpo específico.

6.13.1 Extracción de proteína de tejidos.

En este trabajo se han comparado los niveles de HIF-1 α en la corteza cerebral de ratones postnatales en estadio P10 y ratones adultos de 3 meses, todos ellos de la cepa CD1 IGS. El procedimiento se divide en dos partes. En primer lugar, se disecciona el tejido, en este caso la corteza cerebral, y se congela rápidamente. El tejido puede mantenerse a -80 °C durante semanas hasta que se lleva a cabo la extracción de la proteína.

6.13.1.1 Aislamiento del tejido:

1. Se sacrifican los animales. En el caso de los animales adultos se sacrifican por dislocación cervical mientras que en el caso de los postnatales se lleva a cabo por decapitación.
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 de las cortezas cerebrales en hielo.
4. Se congelan las cortezas cerebrales en nitrógeno líquido y finalmente se guardan a -80°C hasta llevar a cabo la extracción de proteínas.

6.13.1.2 Extracción de la proteína:

Durante todo el proceso se mantiene el tejido en hielo. El tampón de extracción de proteínas sin los inhibidores de proteasas, fosfatasas y el MG-132 puede prepararse y mantenerse a 4 °C. Los inhibidores se añaden justo antes de utilizarlo:

1. Se pesa el tejido. Por cada 0,02g de tejido se añaden 100 μ l de tampón de extracción.
2. Se homogeneiza el tejido por pipeteo, en primer lugar, mediante una P-1000, a continuación, con una P-200 y por último con una jeringuilla 29G.
3. Se incuba el lisado a 4 °C durante 1 hora en agitación.
4. Se centrifuga a 13000g a 4 °C durante 20 minutos en una microcentrífuga.
5. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo.

Por último, se cuantifica los niveles de proteína (Sección 6.12), se diluye en tampón de extracción hasta obtener la concentración deseada y se le añade el tampón de carga Laemmli 5X y se incuba durante 5 minutos a 95 °C.

6.13.2 Preparación de la muestra.

Se ha trabajado tanto con muestras de animales como de cultivos celulares. Todas las muestras se preparan con en el tampón de carga Laemmli. Esta solución desnaturaliza las proteínas y facilita la carga de la muestra en el gel. Para las muestras *in vivo*:

1. Se homogeneiza y cuantifica la proteína del tejido, tal como se ha descrito previamente.
2. Se le añade el tampón de carga previamente calentado a 95 °C.
3. Se hierva la muestra a 95 °C durante 5 minutos para asegurar la desnaturalización de las proteínas.
4. Se guarda a -20 °C.

Para las muestras *in vitro*:

1. En placas de 24 pocillos, se aspira el medio y se añaden 35µl de tampón de carga calentado a 95 °C.
2. Con la ayuda de una punta de P1000 se homogeneiza el cultivo y se transfiere a un tubo Eppendorf.
3. Se hierva la muestra a 95 °C durante 5 minutos para asegurar la desnaturalización de las proteínas.
4. Se guarda a -20 °C.

Antes de cargar las muestras se hierven 5 minutos a 95 °C para asegurar la desnaturalización de las proteínas.

6.13.3 Electroforesis SDS-PAGE.

La electroforesis en gel de acrilamida con SDS es la técnica más común de separación de proteínas por peso molecular. Consiste en la desnaturalización de las proteínas por calor y mediante el detergente SDS y en su posterior separación en un gel de poliacrilamida. El SDS es un detergente que elimina las estructuras secundaria y terciaria y confiere a la proteína carga negativa. De forma que al cargar la mezcla de proteínas en un gel de acrilamida y aplicar una diferencia de potencial estas migran hacia el polo positivo. La velocidad de migración vendrá determinada únicamente por el tamaño de la proteína desplegada, es decir, por su peso molecular.

Como en el caso del gel de agarosa, la migración de las proteínas en el gel de acrilamida también vendrá determinada por el tamaño de los poros en el gel de acrilamida, que a su vez vienen determinados por el porcentaje de acrilamida que compone el gel. Para la realización del SDS-PAGE se utiliza un gel con dos concentraciones de acrilamida diferentes:

- Gel de empaquetamiento (*stacking*): La muestra se carga directamente en este gel con el objetivo de que las proteínas queden alineadas antes de su separación. Tiene un menor porcentaje de acrilamida, sólo del 3,3%.
- Gel de separación (*resolving*): Se trata del gel donde se lleva a cabo la separación por peso molecular. Tiene un mayor porcentaje de acrilamida que oscila entre el 7,5 y el 12%,

en función del grado de resolución deseado. Es decir, cuanto mayor sea el peso molecular de las proteínas que se desee detectar menor será su porcentaje y viceversa.

Para identificar los pesos moleculares de las proteínas analizadas también se carga en el gel un marcador de peso molecular, concretamente Spectra BR de Thermo Scientific™. El sistema de electroforesis utilizado es el *Mini-PROTEAN Tetra Cell* de Bio-Rad.

Los pasos seguidos para realizar la electroforesis SDS-PAGE son los siguientes:

1. Se prepara el gel de acrilamida para la electroforesis. En primer lugar, se prepara el gel de separación. Para 10ml:

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

En cuanto el gel separador ha polimerizado, se prepara el gel de empaquetamiento.

Para 5ml:

Gel empaquetador (5ml)	
Componente	4%
Agua Mili-Q	3,05ml
Tris 1,5 pH 8,8	1,25ml
SDS 10%	50µl
Acrilamida 30%	0,65ml
APS	90µl
TEMED	9µl

2. Se prepara el tampón de electroforesis 1X a partir del stock 10X.
3. Se monta el sistema de electroforesis con los geles preparados y el tampón de electroforesis.
4. Se cargan en los diferentes pocillos, con la ayuda de una pipeta P20, el marcador de peso molecular (7µL) y las muestras (15-25µl). Generalmente se carga entre 15 y 100µg de proteína.

5. Se conectan los electrodos y se aplica una diferencia de potencia de 110V. Se corren las muestras hasta que el frente de avance, marcado por el azul de bromofenol, llega hasta el final de gel (entre 60 y 90 min).
6. Se desmonta el sistema de electroforesis, se extraen los geles y se procede a la transferencia tal y como se describe a continuación.

6.13.4 Transferencia de proteínas.

Tras separar las proteínas por electroforesis es necesario transferirlas a una membrana, generalmente de nitrocelulosa o de difluoruro de poli-vinileno (PVDF), para poder proceder con la detección con anticuerpos. El método utilizado ha sido la electrotransferencia. Este procedimiento se basa en la aplicación de una corriente eléctrica que promueve el movimiento de las proteínas del gel a la membrana. El sistema utilizado es *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* de Bio-Rad. Se han utilizado membranas de PVDF (*Immobilon-P* de Merck), debido a su mayor nivel de resistencia y a su mayor capacidad de unión de proteínas. Los pasos seguidos son:

1. Se prepara el tampón de transferencia 1X. Para 1l: 700ml H₂O Mili-Q, 200ml metanol, 100ml tampón de transferencia 1X.
2. Se extrae el gel del sistema de electroforesis y se descarta el gel de empaquetamiento.
3. Se recorta una membrana PVDF del tamaño del gel de separación y se incuba en metanol durante 30-60 segundos para activarla y a continuación se sumerge en tampón de transferencia.
4. Se cortan dos rectángulos de papel de Whatmann 0,5cm más grandes que la membrana.
5. En un recipiente con tampón de transferencia se prepara el sándwich de transferencia en un casete del sistema de transferencia. El sándwich de transferencia está compuesto por: una esponja rectangular del propio sistema, un rectángulo de papel de Whattmann, el gel de electroforesis, la membrana PVDF, el otro rectángulo de papel de Whattmann y otra esponja. Es muy importante asegurarse que no hay burbujas entre el gel y la membrana, ya que podría afectar a la transferencia.
6. Se cierra el casete y se introduce en la cubeta de transferencia. Al colocar el casete en la cubeta hay que tener en cuenta que las proteínas migran del gel a la membrana al desplazarse hacia el polo positivo.
7. Se añade el tampón de transferencia 1X y un bloque de hielo para evitar el excesivo calentamiento del sistema durante la transferencia.
8. Se aplica una diferencia de potencia de 70V durante 100 minutos.

9. Pasado este período de tiempo, se desmonta el sistema y se pasa la membrana a un recipiente con solución de bloqueo para proceder con la inmunodetección (descrita a continuación). Durante este proceso es muy importante evitar que la membrana se seque. Se puede estimar la eficiencia de la transferencia a partir del marcador de peso molecular.

6.13.5 Ensayo de inmunodetección.

El último paso del *Western blot* consiste en la detección de la proteína de interés mediante un anticuerpo específico contra la misma. En primer lugar, 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 se ha utilizado como solución de bloqueo PBS 1X con leche desnatada en polvo al 5%.

A continuación, se incuba la membrana con un anticuerpo específico para una determinada proteína de interés. Finalmente se detecta el complejo proteína-anticuerpo mediante un anticuerpo secundario contra el primario, conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP). La oxidación del luminol, catalizada por la HRP, genera una pequeña cantidad de luz que puede ser detectada con films fotográficos. Como sustrato de la HRP se ha utilizado el *EZ-ECL Kit* de Biological Industries.

Tanto el anticuerpo primario como el secundario se preparan directamente en solución de bloqueo. Tal como se observa en la Tabla 11, la concentración de anticuerpo primario depende del anticuerpo utilizado. En el caso del secundario, por cada membrana se ha diluido 3µl de anticuerpo en 10ml de solución de bloqueo. La solución de anticuerpo primario se recupera y almacena a -20 °C tras su uso para poder reutilizarla. En cambio, la solución de anticuerpo secundario se prepara de nuevo cada vez y luego se descarta. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Tras extraer la membrana de sistema de transferencia se incuba durante una hora en solución de bloqueo (PBSIX con leche desnatada al 5%) en agitación.
2. Se introduce la membrana en una bolsa de plástico, se añaden 3ml de solución de anticuerpo primario y se sella la bolsa. Se incuba durante toda la noche a 4 °C en agitación orbital.
3. Se recupera la solución de anticuerpo primario.
4. Se traspasa la membrana a un recipiente de plástico y se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS-tween en agitación a temperatura ambiente para eliminar los restos de anticuerpo primario libre.
5. Se incuba con la solución de anticuerpo secundario durante al menos 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

6. Se descarta la solución de anticuerpo secundario. se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS-tween en agitación a temperatura ambiente para eliminar los restos de anticuerpo secundario libre.
7. Se incuba la membrana con el reactivo ECL durante 1 minuto. Este reactivo se prepara previamente mezclando a partes iguales la solución A y B del EZ-ECL Kit.
8. Se detecta la luminiscencia emitida exponiendo la membrana a un film fotográfico *Carestream® BioMax® light film* de Kodak a temperatura ambiente en una cámara oscura.
9. La membrana se puede volver a incubar con otro anticuerpo tras eliminar el anticuerpo utilizado previamente. Para ello se incuba la membrana durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación en solución de borrado (Reblot solution 1X). Tras este período se realizan dos lavados con PBS-tween y se continua a partir del paso 1.

Los films fotográficos con las bandas específicas de cada anticuerpo para cada proteína se escanean para proceder a su análisis por densitometría mediante el software *ImageJ* (Abramoff, Magalhães and Ram, 2004).

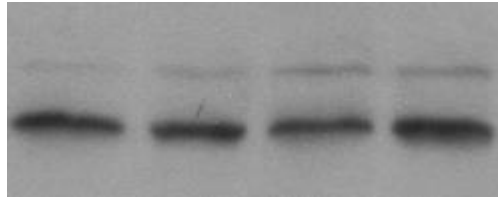
6.13.6 Densitometría.

Esta técnica permite comparar los niveles de una determinada proteína entre diferentes muestras a partir de la medida de la intensidad de las bandas obtenidas tras realizar un *Western blot*. Esto hace del *Western blot* una técnica semicuantitativa. Es posible comparar los niveles de proteína sin conocer la cantidad exacta en cada condición. En el caso de que una banda sea demasiado intensa o, dicho de otra forma, quede quemada en las diferentes condiciones será imposible llevar a cabo la cuantificación. Para analizar un film por densitometría:

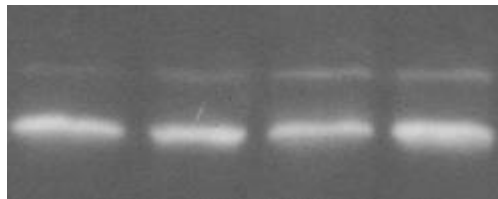
1. Se escanea el film y se guarda en formato *TIFF*.
2. Se abre la imagen con el programa *ImageJ*.



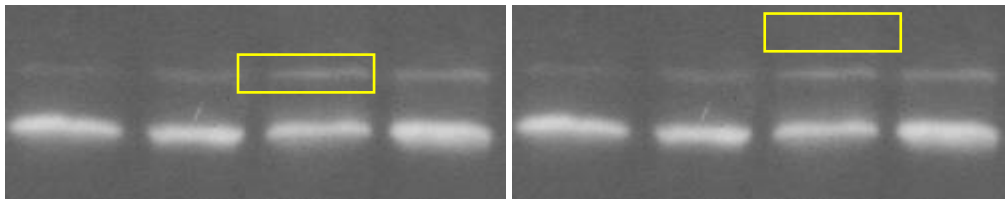
3. Se convierte la imagen en escala de grises 8-bit: *Image>Type>8-bit*



4. Se invierten el grado de grises: *Edit>Invert*



5. Se determina la intensidad de la señal de las bandas de interés. Se determina el área de interés (ROI), y a continuación se selecciona *Analyse>Measure* o sencillamente se pulsa la tecla M. Es importante utilizar la misma área para medir la intensidad de las bandas de las diferentes muestras. Por último, se mide la intensidad del fondo de la imagen para obtener un valor blanco o *background*, que luego se restará a los valores de intensidad de las bandas de las diferentes condiciones. El programa devuelve varios valores entre los que encontramos *Area*, el área del ROI, y *Mean*, el valor de intensidad medio para el ROI.



6. El valor obtenido se normaliza por el valor del control de carga de cada muestra. A lo largo de este trabajo se ha utilizado como control de carga la actina. Por último, se relativizan todos los valores con respecto a la muestra control.

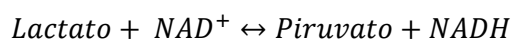
6.14 Medida de los niveles de ATP.

La cuantificación de los niveles de ATP intracelular se ha llevado a cabo mediante el kit comercial *ATPlite Luminescence Assay System* de PerkinElmer. Este sistema se basa en la generación de luz causada por la reacción catalizada por la luciferasa del ATP con la D-luciferasa y el O₂. La cantidad de luz emitida es proporcional a la concentración de ATP. Se ha seguido el protocolo descrito en el kit. Los valores obtenidos se normalizaron por la cantidad de proteína total presente en el lisado celular.

6.15 Medida de los niveles de lactato en el medio.

El piruvato resultante de la glucólisis parcialmente metabolizado en lactato para regenerar el NAD⁺ utilizado por la glucólisis. 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 glicolítica.

El lactato es oxidado por la enzima LDH en presencia de NAD⁺, obteniendo NADH y piruvato:



La hidracina es capaz de convertir el piruvato en piruvato hidrazono, que no puede ser procesado por la LDH. De forma que en presencia de hidracina y NAD⁺ en exceso, la reacción se da únicamente en el sentido oxidativo. En estas condiciones la concentración de lactato en la muestra es proporcional al incremento en los niveles de NADH, cuantificados por absorbancia. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Se extraen hasta 0,5ml de medio de un cultivo celular y se filtra mediante los *Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters, 10K* de Merck. Se carga el volumen extraído en el tubo y se centrifuga a 10000g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar posibles proteínas presentes en el medio. Para una placa de 24 pocillos se ha extraído 14μl de tres pocillos diferentes por condición.
2. Para cada condición se transfiere 50μl de medio filtrado a 5 pocillos de una placa de 96 pocillos transparente. 3 pocillos servirán para cuantificar la cantidad de lactato y los 2 pocillos restantes se utilizarán como blanco, sin enzima.
3. Se prepara la mezcla de reacción teniendo en cuenta que a cada pocillo se le añadirá 200μl de la misma. Se diluye en agua Mili-Q:

Reactivo	Concentración
Glicina	320mM
Hidracina	320mM
NAD+	2,4mM
LDH	2U/ml

Paralelamente se prepara la mezcla para el blanco de la misma forma, pero sin la enzima.

4. Se añaden 200µl 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.
5. Se lleva a cabo la lectura de la absorbancia a 340nm.

Se realiza la media de los 3 pocillos con enzima para cada condición y se le resta la media de sus respectivos blancos. El valor obtenido se normaliza por la cantidad de proteína total en el cultivo. Para ello se aspira el medio restante en el pocillo, se lisa el cultivo añadiendo 125µl de CellLytic™ M de Sigma y se cuantifica la cantidad de proteína presente tal como se ha descrito en la sección 6.12. Por último, se relativiza el valor de las diferentes muestras con respecto al control.

6.16 Inmunofluorescencia.

Este conjunto de técnicas se basa en la detección de una determinada proteína o molécula en células mediante anticuerpos específicos unidos a fluorocromos. Puede ser directa, si el anticuerpo que reconoce a la proteína está unido directamente a la molécula fluorescente, o indirecta, en el caso de que el anticuerpo sea reconocido por un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo. Para la realización de esta técnica las células se han crecido directamente sobre cubreobjetos redondos de vidrio de 12mm de diámetro dispuestos, cada uno, en un pocillo de una placa de 24. Esto permite llevar a cabo todo el proceso en la misma placa y finalmente montar únicamente el cubreobjetos. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Se aspira el medio de cultivo y se añaden 250µl de solución fijadora PFA3% sacarosa.
2. Se guarda la placa en oscuridad y se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos.
3. Se realizan dos lavados con PBS1X.
4. Se lleva a cabo la permeabilización de las membranas celulares incubando las células fijadas en PBS1X con un 0,5% de Nonidet P40 durante 5 minutos.
5. Se realizan 3 lavados con PBS1X.

6. Se añaden 250µl por pocillo de solución de bloqueo con BSA y se incuba en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Se aspira la solución de bloqueo y se añade la solución de anticuerpo primario y se deja en agitación a 4 °C durante toda la noche. Para preparar la solución de anticuerpo primario se diluye en PBS1X:

Componente	Concentración
Anticuerpo	1:250-1:1000
BSA	3%
Azida	1:500

El azida evita el crecimiento de microorganismos permitiendo la reutilización del anticuerpo.

8. Al día siguiente, se recupera el anticuerpo primario y se llevan a cabo 3 lavados con PBS1X de 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con 250µl del anticuerpo secundario diluido en PBS1X a una relación de 1:200.
10. Tras aspirar el anticuerpo secundario se llevan a cabo 3 lavados con PBS1X de 5 minutos.
11. Se procede al montaje de los cubreobjetos en un portaobjeto. Como medio de montaje se utiliza *VECTASHIELD*® de Vectorlaboratories. Este medio de montaje lleva incorporado DAPI, un marcador fluorescente específico del núcleo celular.

En el caso de utilizar un anticuerpo secundario unido a biotina, tras el paso 10 se procedería a una tercera incubación con estreptavidina conjugada con un fluorocromo.

6.17 Técnicas histológicas.

Las técnicas histológicas permiten el análisis de la estructura y las características de los diferentes tejidos. A lo largo de este estudio se ha trabajado con ratones adultos (3-6 meses) y con ratones y ratas post-natales (P10 y P8, respectivamente). Las técnicas histológicas se basan en la disección del tejido, su fijación, la realización de cortes histológicos y por último su marcate o tinción. Los diferentes procesos se describen a continuación.

6.17.1 Fijación.

Se han seguido protocolos de fijación diferentes en función del estadio de desarrollo del ratón. Aunque los trozos de tejido más pequeños, como el encéfalo de un ratón post-natal, pueden fijarse simplemente sumergiéndolos directamente en una solución fijadora, esta estrategia no sirve para los de mayor tamaño, como el cerebro de un ratón adulto. Ya que en estos casos el fijador no puede penetrar con la misma velocidad en todas las regiones. En este caso hay que recurrir a un método de fijación más directo: la perfusión intracardiaca (Gage, Kipke and Shain, 2012; Busquets *et al.*, 2018). Sin embargo, en ambos casos la solución fijadora utilizada ha sido el paraformaldehído (PFA) al 4%, preparada justo el mismo día en que se iba a llevar a cabo el experimento con el objetivo de evitar problemas por contaminaciones o por la formación de precipitados que pueden complicar la completa penetración del tejido.

6.17.1.1 Perfusión intracardiaca de ratones adultos:

1. Antes de empezar el procedimiento se prepara la solución de PFA 4% (Tabla 5).
2. Se anestesian los animales inyección intraperitoneal de ketamina (100mg/kg) y xilacina (10mg/kg). Se evalúa la respuesta a la anestesia pellizcando la cola o la pata trasera o analizando el reflejo ocular.
3. Cuando el animal queda completamente anestesiado, se coloca en cubito supino sobre una superficie de corcho situada en el interior de una cabina de extracción de gases y se inmovilizan sus extremidades con la ayuda de agujas hipodérmicas (Figura 17 A).
4. Rápidamente se abre el pecho del animal a nivel del estómago y se corta hacia arriba, en dirección caudal, hasta romper el diafragma y las costillas (Figura 17 B, C).
5. Se retiran las costillas y el esternón, dejando el corazón y la aorta a la vista (Figura 17 C).
6. Se introduce la cánula por el vértice del corazón, buscando el ventrículo izquierdo (localizado a la derecha; Figura 17 D). Se inicia la perfusión con PFA 4% mediante un equipo de goteo por gravedad. Es muy importante controlar que la velocidad de salida no sea excesiva. Se fija la cánula para que no salga del corazón (Figura 17 E).
7. Cuando el corazón empieza a inflarse, se realiza un corte en la aurícula derecha (de aspecto más oscuro) para permitir la salida de la sangre.

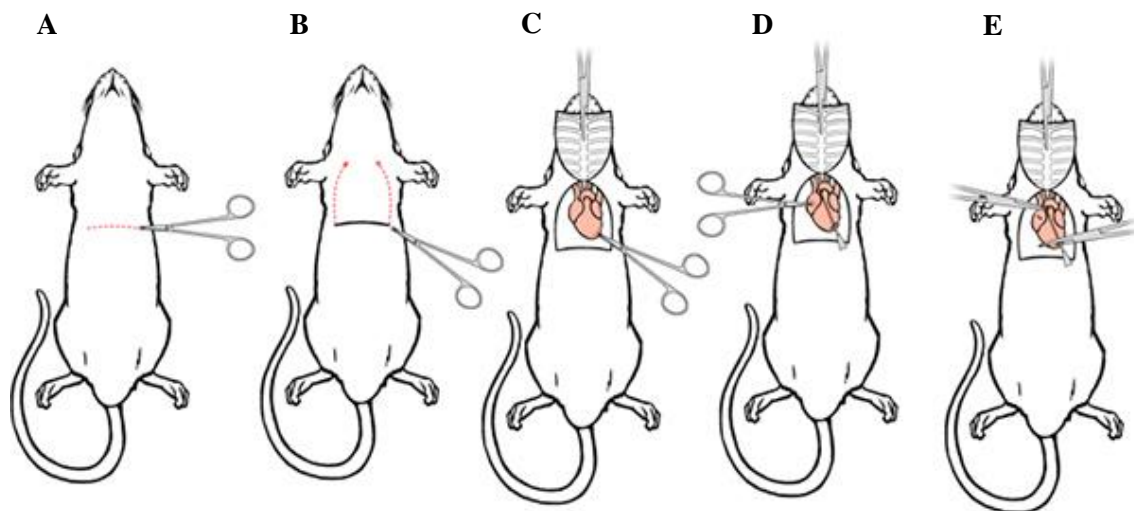


Figura 17: Descripción del proceso de perfusión. A) inmoviliza al animal anestesiado. B) Se abre la cavidad torácica realizando sendos cortes paralelos. C) Se deja al descubierto los pulmones y el corazón. D) Se introduce la cánula en el vértice del corazón. E) Se inicia la perfusión y se realiza un corte en la aurícula derecha. Figura modificada (Gage, Kipke and Shain, 2012).

8. Tras 20 minutos de perfusión, se detiene el goteo y se extrae el encéfalo.
9. Se introduce en un tubo cónico de 50ml lleno de PFA 4% y se mantiene 24 horas a 4 °C.
10. Al día siguiente se pasa a PBS-sacarosa 30% para llevar a cabo la crioprotección del tejido. Cuando se introduce el tejido en esta solución flota, sin embargo, tras uno o dos días, el tejido se hunde hasta el fondo del tubo.

6.17.1.2 Fijación de ratones postnatales:

1. Antes de empezar el procedimiento se prepara la solución de PFA 4%.
2. Los ratones a P10 se sacrifican por decapitación.
3. Se extrae el encéfalo.
4. Se introduce en un tubo cónico de 50ml lleno de PFA 4% y se mantiene 24 horas a 4 °C.
5. Al día siguiente se pasa a PBS-sacarosa 30% para llevar a cabo la crioprotección del tejido. Cuando se introduce el tejido en esta solución flota, sin embargo, tras uno o dos días, el tejido se hunde hasta el fondo del tubo.

6.17.2 Realización de cortes histológicos.

Los cortes histológicos se han obtenido por criosección, con la ayuda de un criostato. En esta técnica los tejidos son endurecidos antes por congelación. Para la realización de ensayos de inmunohistoquímica y de inmunofluorescencia se han realizado secciones coronales de 30µm de grosor mientras que para la realización de la tinción de Golgi han sido coronales de 150µm. El protocolo seguido se describe a continuación:

1. Tras sumergirse en la solución de PBS-sacarosa 30%, los encéfalos, tanto de animales post-natales como de adultos, se secan con la ayuda de papel absorbente, se congelan con la ayuda de hielo seco y finalmente se transfieren a un congelador a -80 °C.
2. Antes de cortar, la temperatura del criostato se ajusta entre -18 °C y -20 °C. La temperatura de la cámara siempre se mantiene uno o dos grados por debajo de la temperatura de la muestra.
3. Se monta el encéfalo sobre la superficie portamuestras del criostato con la ayuda de OCT. El OCT se congela rápidamente a -20 °C y permite cortar el tejido fácilmente sin romperlo.
4. Se coloca el portamuestras con la muestra en el criostato y se procede a cortar.
5. Las secciones obtenidas pueden recogerse con la ayuda de un pincel y almacenarse mediante dos estrategias diferentes. En el caso de los animales adultos se depositan en un tubo Eppendorf con solución de crioprotección (Tabla 5) y finalmente se almacenan a -20 °C. En el caso de los ratones postnatales o las muestras empleadas en la tinción de Golgi, se montan directamente en portaobjetos *Superfrost PlusTM*, que tienen un recubrimiento cargado positivamente que facilita la adhesión de la muestra, y guardarlas a 4 °C hasta llevar a cabo el marcateo o tinción deseado.

Las muestras guardadas en solución de crioprotección se montan posteriormente en los portaobjetos *Superfrost PlusTM*. La solución de crioprotección con los cortes se aboca en una placa de Petri con PB 0.1M y tritón X-100 0.1%. Los portaobjetos se sumergen parcialmente en la placa y finalmente, con la ayuda de un pincel, se van colocando las secciones en el portaobjetos.

6.17.3 Inmunohistoquímica.

La inmunohistoquímica es una técnica que permite la detección y la consecuente localización de proteínas o antígenos en un tejido mediante el uso de anticuerpos específicos contra estos antígenos. A lo largo de este trabajo se ha llevado a cabo la detección indirecta, es decir, se ha utilizado un anticuerpo (primario) para detectar un determinado antígeno y a continuación se ha detectado este antígeno con otro anticuerpo (secundario) unido a una enzima o a un fluorocromo,

en el caso de la inmunohistofluorescencia, que permite la detección del primer anticuerpo. El secundario puede a su vez ser reconocido por otro anticuerpo (terciario) unido también a una enzima o a una molécula fluorescente. El protocolo seguido se detalla a continuación.

Antes de empezar el proceso, es muy importante dejar secar las muestras montadas sobre el portaobjetos para asegurar su adhesión al mismo. Dado que la incubación con el anticuerpo primario se lleva a cabo directamente sobre el cubreobjetos, alrededor de la muestra se dispone una solución hidrofóbica con la ayuda del *Super PAP Pen* (Invitrogen). Todo el proceso se lleva a cabo en una cámara de humedad para evitar la evaporación de la solución con anticuerpo primario. En este caso se utiliza un anticuerpo primario que es reconocido por otro secundario unido a una molécula de biotina que finalmente es reconocida por otra de estreptavidina unida a una peroxidasa que podemos detectar tras el proceso de revelado, en el que la enzima cataliza la oxidación de un sustrato para dar lugar a un precipitado oscuro. El protocolo se describe a continuación:

1. Se llevan a cabo tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X.
2. Se realiza la inactivación de las peroxidases endógenas del tejido incubando durante 30 minutos los cortes en PBS 1X con un 3% H₂O₂ y un 10% de metanol.
3. Se llevan a cabo tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X.
4. Se llevan a cabo tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X con 0,1% Tritón X-100.
5. Se bloquea el tejido incubandolo durante dos horas a temperatura ambiente con la solución de bloqueo con un 10% de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés).
6. Se llevan a cabo tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X con 0,1% Tritón X-100.
7. Se añade la solución de anticuerpo primario y se deja a 4 °C durante toda la noche.
Para preparar la solución de anticuerpo primario se diluye en PBS1X:

Componente	Concentración
Anticuerpo	1:250-1:1000
FBS	5%
Gelatina	0,2%
Tritón X-100	0,3%
Azida	0,02%

8. Al día siguiente, se recupera el anticuerpo primario y se llevan a cabo tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X con 0,1% Tritón X-100.
9. Se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación con la solución del correspondiente anticuerpo secundario biotinilado:

Componente	Concentración
Anticuerpo	1:200
FBS	5%
Gelatina	0,2%
Tritón X-100	0,3%

10. Tras aspirar el anticuerpo secundario se llevan a cabo tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X con 0,1% Tritón X-100.
11. Se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación con la solución de estreptavidina-peroxidasa (HRP):

Componente	Concentración
Strept-HRP	1:400
FBS	5%
Gelatina	0,2%
Tritón X-100	0,3%

12. Tras aspirar la streptavidina-HRP se llevan a cabo tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X con 0,1% Tritón X-100.
13. Se llevan a cabo tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X.
14. Se llevan a cabo tres lavados de 5 minutos cada uno con PB 0,1M.
15. Se lleva a cabo el pre-revelado de la muestra incubandola durante 10 minutos en agitación en una solución de PB con diaminobenzidina (DAB) al 0,03%, CoCl_2 al 0,015% y NiCl_3 al 0,015%.
16. Se añade a la solución de pre-revelado H_2O_2 hasta alcanzar una concentración de 0,01% y se incuba durante entre 5 y 30 minutos para llevar a cabo el revelado final.

Antes de montar se mira en el microscopio la muestra para confirmar si ha funcionado el revelado o si debe alargarse más el tiempo de incubación. Los portaobjetos se dejan secar y se deshidratan (incubaciones de 5 minutos en etanol 70%, etanol 90%, 2 x etanol 100%, 2 x xileno) antes de ser montados con Eukitt de Sigma.

6.17.3.1 Immunohistofluorescencia:

La utilización de un marcage fluorescente permite llevar a cabo un doble marcage para poder detectar dos proteínas diferentes al mismo tiempo. Además, el marcage con la tinción de Hoescht, que interacciona con el DNA, permite marcar al mismo tiempo el nucleo celular. El proceso es igual hasta llegar al proceso de revelado. En lugar de estar unidos a una peroxidasa los anticuerpos secundarios o terciarios están unidos a un fluorocromo que puede ser visualizado con la ayuda de

un microscopio de fluorescencia. En este caso, no es necesario llevar a cabo el paso de inactivación de peroxidasas ni el revelado. Tras realizar la última incubación con los anticuerpos secundarios o terciarios unidos a fluorocromos se llevan a cabo los respectivos lavados con PBS1X, una incubación de 7 minutos con el reactivo de Hoescht 1:400 en PBS1X y tras tres últimos lavados de 5 minutos con PBS1X se deja secar y se monta con medio Fluoromont de Sigma. Durante este proceso las muestras se mantienen en oscuridad.

Para la detección de proteínas muy poco abundantes se modifica ligeramente el protocolo. Antes de llevar a cabo el bloqueo se realiza el bloqueo de la actividad peroxidasa endógena tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Tras la incubación con el anticuerpo primario las muestras se incuban con el anticuerpo secundario biotinilado disuelto en relación 1:500 en PBS1X con FBS 5% (Jackson ImmunoResearch) durante 2 horas a 4 °C. La señal se amplifica en dos pasos: en primer lugar se incuba con la estreptavidina-HRP (Vector Labs) durante 2 horas a 4 °C, se añade la Tyramida-Cy3 a una relación 1:50 del *TSA® Plus Cyanine 3 detection kit* (Perkin Elmer) y se deja incubar durante 4 minutos.

La fijación con PFA puede modificar químicamente a las proteínas del tejido, cosa que puede dificultar su detección. El proceso de recuperación antigénica permite eliminar algunos de estos cambios y por lo tanto mejorar su detección. Para ello los portaobjetos con la muestra se incuban a 60 °C durante 10 minutos con citrato de sodio 10mM pH 6,0.

6.17.4 Tinción de Golgi.

Esta tinción de plata ha sido ampliamente utilizada desde el siglo XIX para estudiar la morfología neuronal. La técnica se basa en la formación de precipitados opacos cromatos de plata, como producto de la reacción entre el bicromato de potasio y el nitrato de plata. Para la realización de este trabajo se ha utilizado el FD Rapid GolgiStain Kit:

1. 24 horas antes de sacrificar a los animales se prepara la mezcla de las soluciones A y B a partes iguales y se dejan reposar en oscuridad para que su contenido en metales precipite. Hay que evitar exponer ambas soluciones a la luz.
2. Se añaden a tubos de 10ml con el fondo curvado 2,5ml de la mezcla de A i B. Cada encéfalo extraído se depositará en un tubo diferente.
3. Se sacrifican los animales. En el caso de las ratas post-natales se ha llevado a cabo por decapitación mientras que en el caso de los ratones adultos se ha hecho por desnucación.
4. Se extrae el cerebro, limpiando lo mejor posible los restos de sangre y meninges, y se deposita en un tubo con la mezcla de soluciones A y B.
5. Pasadas entre 6 y 24 horas, se cambia la mezcla de soluciones A i B por mezcla fresca.

6. Se incuban los cerebros durante dos semanas agitando los tubos dos veces a la semana.
7. Pasadas dos semanas, se cambia la solución por solución C.
8. Pasadas 24 horas se cambia por nueva solución C.
9. Se dejan los cerebros en solución C entre 72 horas y una semana protegidos de la luz.

A partir de este punto se procede a la realización de los cortes histológicos de los cerebros procesados. En este trabajo se han realizado cortes coronales de 150 μ m de ancho con la ayuda de un criostato:

1. Se elimina la solución C y se secan los cerebros con papel absorbente.
2. Se congelan los cerebros, en primer lugar, cubriéndolos de hielo seco y a continuación se almacenan a -80 °C.
3. Antes de empezar a cortar, se programa la temperatura de la cámara del criostato a -24 °C y la de la muestra a -23 °C.
4. Se monta el cerebro sobre el portamuestras mediante agua destilada.
5. El cerebro se cubre con una fina capa de agua destilada con la ayuda de un pincel y se deja durante 10 minutos en hielo seco para que se congele.
6. Antes de cortar se mantiene la muestra durante 5 minutos en el criostato.
7. Las muestras cortadas se montan directamente sobre portaobjetos *Superfrost PlusTM* con solución C sobre ellas.
8. Se dejan secar los portaobjetos a temperatura ambiente durante un período de tiempo entre 24 y 48 horas, hasta un máximo de 72 horas.

Por último, se lleva a cabo la tinción. Dado que todo el proceso se lleva a cabo sobre el mismo cubre se dispone alrededor de la muestra una solución hidrofóbica con la ayuda del Super PAP Pen (Invitrogen). Todo el proceso se lleva a cabo en la campana de extracción de gases:

1. Se realizan dos lavados de 4 minutos con agua miliQ.
2. Se incuban los cortes durante 10 minutos en una mezcla de solución D (10ml), solución E (10ml) y agua miliQ (20ml).
3. Se realizan dos lavados de 4 minutos con agua miliQ.
4. Se deshidratan las secciones incubándolas durante 4 minutos en cada una de las siguientes soluciones: 50% etanol, 75% etanol, 95% etanol, etanol absoluto (x2).
5. Se realizan dos lavados de 4 minutos con xileno.
6. Se montan en Eukitt sin dejar que el xileno se seque completamente.

6.18 Análisis de viabilidad.

La viabilidad o mortalidad celular de los cultivos primarios de neuronas corticales se analiza fijando los cultivos y marcando los núcleos celulares con DAPI (Sección 6.16) para a continuación contar el porcentaje de núcleos picnóticos, característicos de las neuronas que experimentan un proceso de muerte regulada, en el cultivo. Para ello se han tomado imágenes mediante el microscopio de fluorescencia con el objetivo 10X y los núcleos se han contado mediante el *plugin Cell counter* del software *ImageJ* (*Plugins>Analyze>Cell Counter>Cell Counter*).

6.19 Microscopía.

6.19.1 Microscopía de campo claro.

La microscopía de campo claro es el método de microscopía óptica más común, su fuente de iluminación es sencillamente la luz blanca. Con su ayuda se pueden observar muestras teñidas con diferentes colorantes histológicos, como por ejemplo la tinción de Golgi, utilizada para analizar la complejidad dendrítica *in vivo*. El microscopio utilizado durante la realización de este trabajo ha sido un Olympus BX61/BX62.

6.19.1.1 Análisis de la morfología neuronal:

El análisis de la morfología neuronal se ha llevado a cabo a partir de cortes de cerebros de ratas post-natales y ratones adultos cuyas neuronas han sido marcadas mediante la tinción de Golgi. Las imágenes de las diferentes neuronas y de su árbol dendrítico se toman con el objetivo 10X. En el caso de que todo el árbol dendrítico no sea abarcado con una sola imagen se toman diferentes imágenes que lo cubran y a continuación se juntan. Para evaluar las posibles diferencias en la morfología neuronal se lleva a cabo un análisis de Sholl, basado en la generación de un perfil de intersección obtenido tras contar el número de ramas neuríticas a una determinada distancia del soma (Bird and Cuntz, 2019). En este trabajo el análisis de Sholl se ha llevado a cabo con el software *ImageJ* (Abramoff, Magalhães and Ram, 2004):

1. En el caso de que se hayan tomado varias imágenes para cubrir una neurona se ensamblan con la ayuda del *plugin Grid/Collection stitching* (*Plugins>Stitching> Grid/Collection stitching*) de *ImageJ*.
2. Se invierte el grado de grises: *Edit>Invert*

3. Se traza el árbol neuronal con la ayuda del plugin *Simple neurite tracer* (*Plugins>Segmentation> Simple neurite tracer*). El programa permite trazar de forma semi-automática cada extensión. Con la ayuda del ratón se marca el inicio de la extensión y a continuación el final, y el programa traza la extensión dendrítica entre ambos puntos. Si el trazo es correcto se pulsa la tecla *y*. Cuando se ha trazado por completa una neurita se pulsa la tecla *f*.

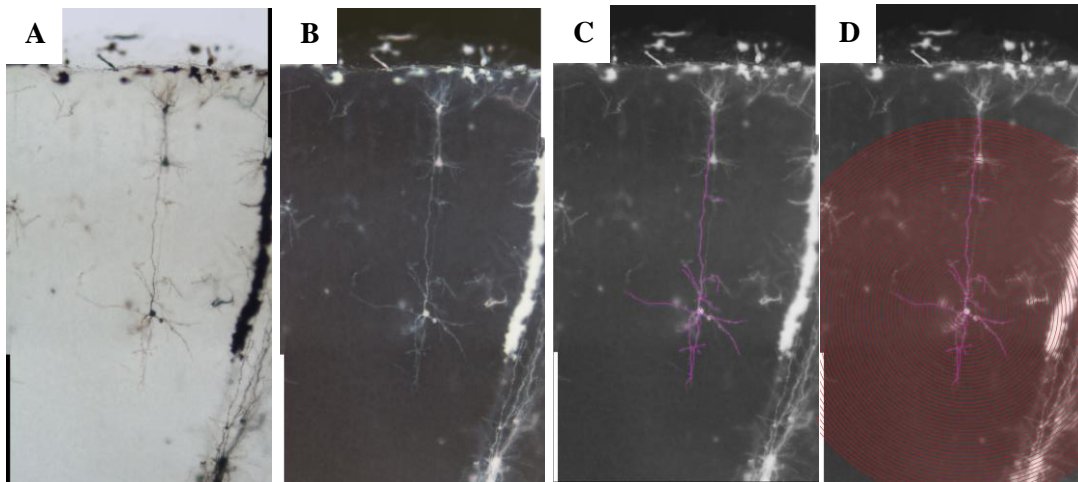


Figura 18: Análisis de la morfología del árbol dendrítico mediante el análisis de Sholl. Se describe paso a paso el proceso para llevar a cabo el análisis de Sholl mediante el software *ImageJ*. A) Se obtiene la imagen en formato TIFF y se convierte en imagen de 8-bit. B) Se obtiene la imagen invertida. C) Se trazan las prolongaciones dendríticas mediante el plugin *Simple Neurite Tracer*. D) Se lleva a cabo el análisis de Sholl con el mismo plugin *Simple Neurite Tracer*. Las líneas rojas representan las circunferencias en las que se cuantifica el número de cortes.

4. Para realizar el análisis de Sholl se selecciona una extensión con la tecla *g* y a continuación se sitúa el ratón en el soma de la neurona y se pulsán las teclas *Control*, *Alt*, *Shift* y *a*. En el menú que aparece se seleccionan las opciones *Use standard axes*, *No normalization of intersections* y por último se indica el valor de *Radius step size*. Esta última opción hace referencia a cuánta distancia se deja entre cada medida. A lo largo de este trabajo el valor utilizado fue de $10\mu\text{m}$.
5. El resultado se representa en un gráfico con la distancia hasta el soma en el eje de abscisas y el número de extensiones en el de ordenadas.

6.19.2 Microscopía de fluorescencia y confocal.

En la microscopía de fluorescencia un láser genera una radiación de una determinada longitud de onda que excita un determinado fluoróforo, que consecuentemente emite otra radiación de una longitud de onda mayor que puede ser visualizada con la ayuda de diferentes filtros. El microscopio de fluorescencia utilizado a lo largo de este trabajo es un Olympus BX61/BX62.

El microscopio confocal funciona de forma similar al de fluorescencia. No obstante, tiene una serie de características propias que le permiten obtener imágenes de mayor calidad ya que es capaz de filtrar la luz que proviene de un plano fuera de foco. Con el microscopio confocal es posible obtener secciones ópticas en el plano z de entre 0,16 y 1,5 μ m. 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.

6.19.2.1 Análisis del transporte de glucosa:

Para cuantificar el transporte de glucosa hasta el citoplasma se analizó la captación de la 2-[N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2 deoxy-glucose (2-NBDG; Life Technologies). El 2-NBDG es un análogo fluorescente de la glucosa, con niveles de máximos de excitación/emisión de ~ 465/540 nm (Yamada *et al.*, 2007). El protocolo seguido se describe a continuación:

1. Tras la estimulación neuronal en medio TM₀, se substituye el medio por medio SGG sin rojo fenol y con glucosa a una concentración 0.5mM. Previamente, se llevan a cabo un lavado con este medio para eliminar los restos de rojo fenol y glucosa.
2. Se incuban las células a 37 °C y un 5% de CO₂ durante 30 minutos, con el objetivo de que se estabilicen los gradientes de iones.
3. Se añade la 2-NBDG a una concentración final de 100nM. A partir de este punto las células se mantienen en oscuridad.
4. Se incuban las células a 37 °C y un 5% de CO₂ durante 30 minutos.
5. Se cambia el medio por medio SGG sin rojo fenol y con glucosa a una concentración 0.5mM y se incuba a 37 °C y un 5% de CO₂ durante 5 minutos.
6. Se lleva a cabo un lavado con medio SGG sin rojo fenol y con glucosa a una concentración 0,5mM.
7. Se toman imágenes con el microscopio de fluorescencia invertido con el objetivo 40X.

Se determina la intensidad fluorescencia en el citoplasma celular mediante el software *ImageJ* (Abramoff, Magalhães and Ram, 2004). Se determina el área de interés (ROI), y a continuación se selecciona *Analyse>Measure* o sencillamente se pulsa la tecla M. Es importante utilizar el mismo ROI para medir la intensidad de todas las células. Por último, 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.

6.19.2.2 Análisis del crecimiento neurítico:

El análisis del crecimiento neurítico se ha llevado a cabo a partir de cultivos de neuronas corticales transfectadas con la proteína GFP. La expresión de esta proteína permite visualizar todo el citoplasma neuronal y por lo tanto la completa extensión de axón y dendritas. Los cultivos destinados a este análisis se llevan a cabo sobre cubreobjetos de vidrio. En primer lugar, las neuronas se transfectan con esta proteína y con los otros plásmidos de interés. La mezcla de transfección con la lipofectamina y los plásmidos se diluye entre 5 o 10 veces con el objetivo de conseguir una baja eficiencia de transfección, ya que en el caso de que un gran número de neuronas se transfecten sus proyecciones se superponen y es muy complicado llevar a cabo el análisis de su extensión. 24 horas tras la transfección, se cambia el medio de TM_{ITS} a TM_O y se lleva a cabo el tratamiento de estimulación sináptica. Tras 48 horas, los cultivos se fijan y se lleva a cabo la amplificación de la señal de GFP por inmunofluorescencia (Sección 6.16). Tras montar los cubreobjetos se toman imágenes de diferentes neuronas por cada condición mediante el microscopio de fluorescencia y el objetivo 4X. Como en el caso del análisis de la complejidad neuronal en el caso de que todas las extensiones de una neurona no pueden ser abarcados por una sola fotografía, se toman varias y se ensamblan con la ayuda del plugin *Grid/Collection stitching* (*Plugins>Stitching>Grid/Collection stitching*) de ImageJ. A partir de este punto todo el proceso es similar (Sección 6.19.1.1) hasta llegar al punto 4. En lugar de llevar a cabo el análisis de Sholl se lleva a cabo la medida de la longitud de los trazos seleccionados mediante *Analysis>Measure Paths...* El programa devuelve una tabla con la longitud de cada trazo, por lo tanto, como último paso tan solo queda identificar que trazos se corresponden con las dendritas y cuales con el axón y realizar la suma.

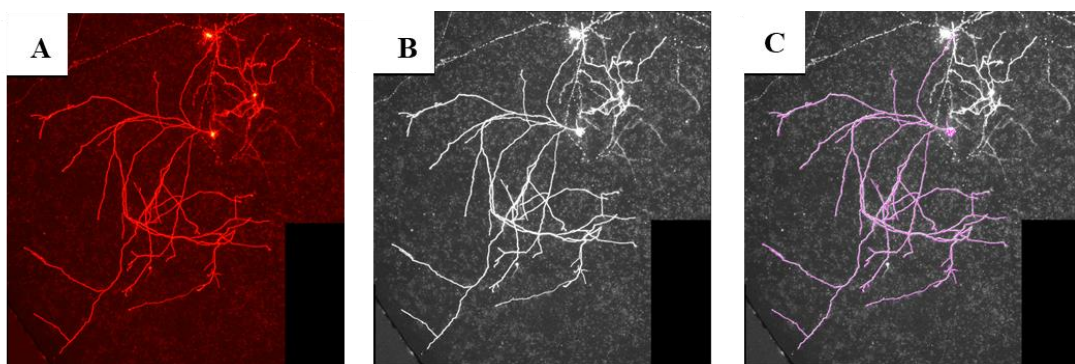


Figura 19: Análisis de la longitud neurítica. Se describe paso a paso el proceso para llevar a cabo la medida de la longitud del árbol neurítico mediante el software *ImageJ*. A) Se obtiene la imagen en formato TIFF y se convierte en imagen de 8-bit. B) Se obtiene la imagen invertida. C) Se trazan las prolongaciones dendríticas mediante el plugin *Simple Neurite Tracer* y se realiza la medida de la longitud de los trazos.

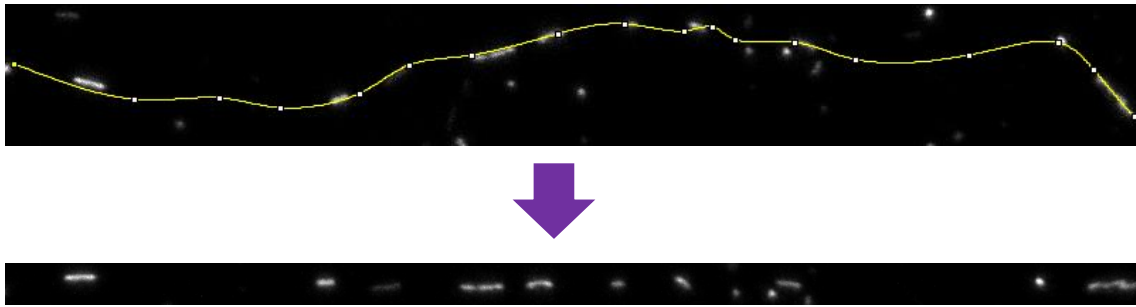
6.19.2.3 Análisis del movimiento mitocondrial:

A pesar de que la mayoría de mitocondrias suelen mantenerse estáticas, algunas de ellas pueden desplazarse rápidamente a lo largo de la célula. En este estudio se ha analizado el movimiento mitocondrial a lo largo del axón. Para ello las neuronas se han transfectado con la proteína mitoRFP, una proteína fluorescente que se localiza específicamente en las mitocondrias, y con la GFP, que marcará el citoplasma. El protocolo seguido se describe a continuación:

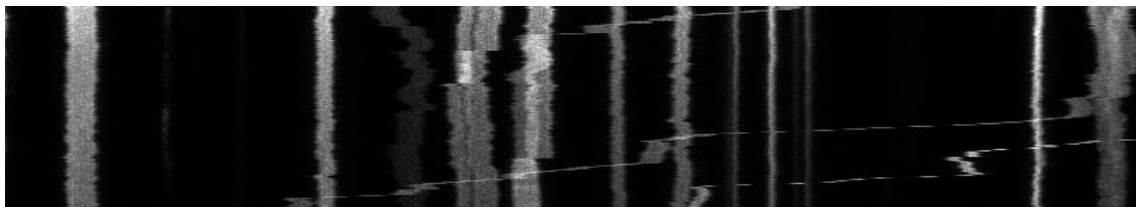
1. Las neuronas se mantienen y estimulan en medio TM_0 .
2. Se realiza un lavado con SGG sin rojo fenol con glucosa 5mM.
3. Se cambia el medio por SGG sin rojo fenol con glucosa 5mM. El medio TM_0 utilizado previamente contiene una elevada concentración de glucosa (30mM). A elevadas concentraciones de glucosa el movimiento mitocondrial se ve muy reducido por lo tanto para realizar el análisis reducimos la concentración en el medio (Pekkurnaz *et al.*, 2014). Se incuban las neuronas durante 1 hora en el medio con baja concentración de glucosa.
4. Se toman imágenes de un fragmento del axón alejado al menos 50 μm del soma con la ayuda del microscopio confocal. Se utiliza un aumento 63X. Se realiza un *stack* de imágenes cada 0.5 μm , para visualizar toda la profundidad del axón, cada 2 segundos durante un período de tiempo de 5 minutos. Todas las imágenes se toman con la misma orientación de forma que a la izquierda queda el extremo cercano al soma y a la derecha el más alejado.

A partir de las imágenes tomadas se lleva a cabo el análisis del movimiento mitocondrial mediante la construcción de un quimograma y el programa *ImageJ*, tal como se describe a continuación:

1. Las imágenes obtenidas están conformadas por tres *stacks* diferentes: canales de fluorescencia, tiempo y profundidad. En primer lugar, se realiza la proyección Z tomando para cada *stack* los píxeles de máxima intensidad (*Image>Stacks>Z Project...*).
2. Mediante la opción *Segmented line* se traza el axón en el canal correspondiente con la fluorescencia verde. Se almacena el ROI pulsando la tecla *t*.
3. Se separan los dos canales mediante *Image>Color>Split channels*.
4. Se marca el ROI almacenado en el canal de fluorescencia roja y se genera una imagen rectangular mediante el *plugin Straighten (Edit>Selection>Straighten)*. Utilizamos como *Line width* 30 píxeles y marcamos la opción *Process the entire stack*.



5. Para obtener una representación temporal de las mitocondrias a lo largo del axón utilizamos *Image>Stacks>Reslice[/]...*
6. Se realiza la proyección Z tomando para cada *stack* los píxeles de máxima intensidad (*Image>Stacks>Z Project...*), obteniendo el denominado quimograma. Las líneas resultantes se corresponden con las mitocondrias. En horizontal se representa la distribución a lo largo del axón y en vertical la distribución temporal. Por lo tanto, las líneas completamente perpendiculares a la extensión del axón se corresponden con a mitocondrias estáticas mientras que las inclinadas se corresponden con mitocondrias en movimiento. Si se desvían hacia la izquierda se corresponde con movimiento retrógrado mientras que si lo están hacia la derecha con anterógrado. En el caso de variar su dirección se considera movimiento bidireccional.



6.19.2.4 Análisis del Ca^{2+} citoplasmático:

Los niveles de Ca^{2+} se han monitorizado con la sonda fluorescente Fluo-4 (Life Technologies) mediante microscopía confocal. Tras interactuar con el ión Ca^{2+} Fluo-4 incrementa el nivel de fluorescencia emitida. Presenta niveles máximos de excitación/emisión de $\sim 465/540$ nm. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Las neuronas se mantienen y estimulan en medio TM_0 .
2. Se lava la placa con PBS 1X enriquecido con $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.
3. Se cambia el medio por SGG sin rojo fenol con HEPES 10mM y glucosa 10mM.
4. Se añade la sonda Fluo-4 a una concentración final de $2\mu\text{M}$.
5. Se incuba durante 45 minutos a 37°C en un 5% de CO_2 . A partir de este punto el cultivo se mantiene en oscuridad.

6. Se llevan a cabo dos lavados con PBS1X.
7. Se cambia el medio por SGG sin rojo fenol.
8. Se incuba durante 30 minutos a 37 °C en un 5% de CO₂ para dejar de-esterificar.
9. Se excita con un láser de 488nm y se observa con un filtro de 516nm.
10. Se toma una imagen cada 5 segundos durante un periodo de un minuto a un aumento de 40X.

La intensidad de fluorescencia se determina igual que en la Sección 6.19.2.5.

6.19.2.5 Análisis de hipoxia:

Para la medida del nivel de hipoxia se utiliza la sonda fluorescente *Image-iT™ Red Hypoxia Reagent* (Life Technologies). En condiciones de normoxia esta sonda no es fluorescente, sin embargo, a medida que los niveles de oxígeno se reducen incrementa su emisión de fluorescencia. El medio de cultivo se cambia por medio HBSS (sin rojo fenol) y se añade directamente la sonda a una concentración final de 10µM. Antes de llevar a cabo la medida se incuba el cultivo con la sonda durante 30 minutos a 37 °C en un 5% de CO₂. La sonda se excita a 490nm y su emisión se mide con un filtro de 610nm. Finalmente, se toman imágenes con el microscopio de fluorescencia invertido con el objetivo 40X. La intensidad de fluorescencia se determina igual que en la Sección 6.19.2.5.

Para someter el cultivo a condiciones de hipoxia se coloca el cultivo en una cámara de hipoxia acoplada al microscopio. A continuación, se inyecta gas con una composición 95% N₂/5% CO₂ a un caudal de 20 l/min a 37°C durante 30 minutos.

6.20 Análisis estadístico.

Con el objetivo de realizar un análisis estadístico, se han llevado a cabo al menos 3 réplicas independientes de cada experimento ($n \geq 3$). Todos los datos se muestran con la media \pm S.E.M. (error estándar de la media). La comparación de medias entre dos grupos se ha llevado a cabo mediante la prueba t de Student. Las comparaciones entre tres o más grupos se han llevado a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test *post-hoc* de Tukey.

7. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es conocer con mayor detalle los cambios a nivel metabólico inducidos por la actividad sináptica para poder generar los lípidos necesarios para la generación de las nuevas membranas utilizadas en el crecimiento neuronal. Más concretamente, estudiar cómo la actividad sináptica modula el metabolismo de la glucosa junto con su implicación en el desarrollo neuronal. Por lo tanto, los objetivos específicos de este trabajo son:

- 1. Conocer el destino de la glucosa en las neuronas sinápticamente activas.**
- 2. Analizar los cambios en el metabolismo de la glucosa en las neuronas sinápticamente activas.**
- 3. Determinar el mecanismo mediante el cual la actividad sináptica regula el metabolismo de la glucosa.**
- 4. Estudiar la importancia de la activación del metabolismo de la glucosa en el desarrollo neuronal.**
- 5. Comprobar si la actividad sináptica está implicada en la regulación de otras vías metabólicas.**

8. RESULTADOS

8.1 La actividad sináptica depende del metabolismo de la glucosa para promover el crecimiento neurítico.

8.1.1 La actividad sináptica estimula la expresión de enzimas implicadas en la síntesis de lípidos.

La actividad neuronal promueve el crecimiento neurítico, lo que requiere el suministro de nuevos lípidos para permitir el crecimiento de las membranas celulares (Futerman and Banker, 1996). A lo largo de este trabajo se han estudiado y caracterizado los posibles cambios a nivel metabólico experimentados por una neurona tras ser estimulada sinápticamente en cultivos primarios de neuronas corticales de embriones de rata. Tal como se ha descrito en el apartado de *Materiales y métodos* la actividad sináptica de los cultivos de neuronas se estimuló mediante el tratamiento combinado con un antagonista de los receptores inhibitorios de GABA, la bicuculina (Bic), y un antagonista de los canales de K⁺, la 4-aminopiridina (4-AP) (Hardingham, Arnold and Bading, 2001). Para facilitar la escritura y la representación de los resultados a lo largo de este escrito se hará referencia a este tratamiento sencillamente como *Bic*. Tal como se observa en el *Western blot* llevado a cabo por Sergi Casellas (Figura 20 A-C), tras estimular la actividad sináptica de los cultivos neuronales durante un período de 4h se observó un incremento en los niveles de proteína de FASN y ACLY, dos enzimas clave en la síntesis de nuevos lípidos. La primera es la encargada de catalizar la síntesis de ácidos grasos mientras que la segunda es la responsable de la conversión de citrato en acetil-CoA en el citoplasma.

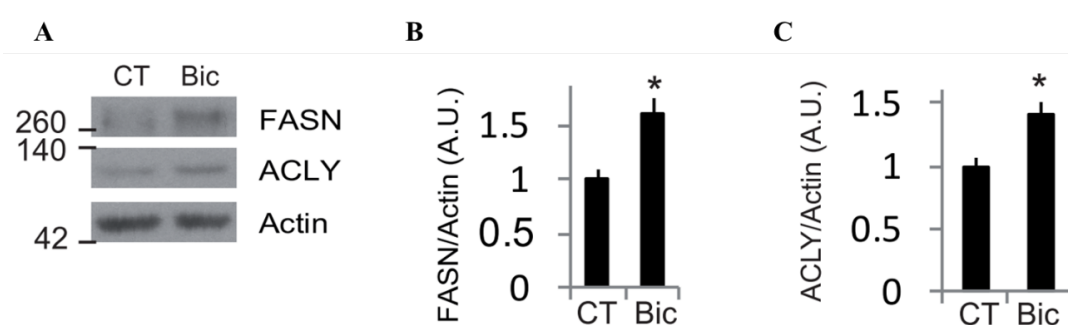


Figura 20: La actividad sináptica induce la síntesis de enzimas implicadas en la síntesis de lípidos. A) Tras estimular las neuronas corticales con Bic+4-AP durante 4 horas se analizaron los niveles de las proteínas indicadas por *Western blot*. B y C) Densitometría de las proteínas indicadas. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas.

8.1.2 La actividad sináptica promueve la incorporación de glucosa en lípidos.

El acetil-CoA sintetizado a partir los metabolitos intermediarios del catabolismo de la glucosa es el principal precursor para la síntesis de lípidos (Hamilton *et al.*, 2007; Pietrocola *et al.*, 2015). El piruvato obtenido como producto final de la glucólisis es transportado hasta la matriz

mitocondrial e incorporado al ciclo de Krebs en forma de acetyl-CoA. El citrato generado a partir de esta vía es transportado hasta el citoplasma donde, gracias a la acción de la enzima ACLY, es finalmente convertida en acetyl-CoA (Figura 9). Para estudiar el papel de la glucosa en la síntesis de nuevos lípidos se analizó el nivel de incorporación de glucosa marcada radioactivamente en lípidos. Tras 48 horas de estimulación, se observó un incremento en la incorporación de glucosa en lípidos en las neuronas estimuladas (Figura 21 A).

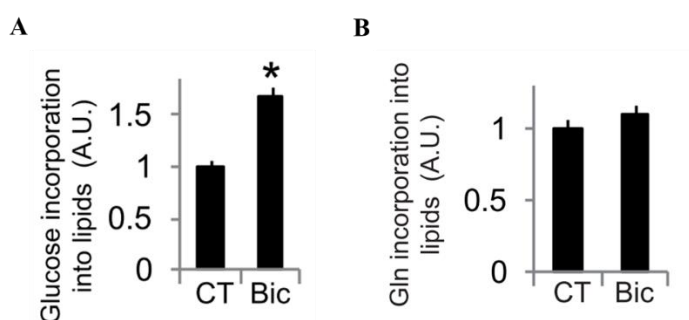


Figura 21: La actividad sináptica promueve la incorporación de glucosa en lípidos. A) Neuronas incubadas con ^{14}C -U-glucosa y estimuladas o no con Bic+4-AP durante 48 horas (CT). Tras este período de tiempo se aislaron los lípidos de los cultivos de cada condición y se cuantificó su nivel de radioactividad. El valor se normalizó por la cantidad de proteína total. n=4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. B) Neuronas incubadas con ^3H -glutamina y estimuladas o no con Bic+4-AP durante 48 horas (CT). Tras este período de tiempo se aislaron los lípidos de los cultivos de cada condición y se cuantificó su nivel de radioactividad. El valor se normalizó por la cantidad de proteína total. n=4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas.

La glutamina es otra de las posibles fuentes de acetyl-CoA destinado a la síntesis de lípidos (Pietrocola *et al.*, 2015). Se ha comprobado que en ausencia de glucosa o en presencia de mitocondrias disfuncionales, incapaces de metabolizar el piruvato, las células tumorales pueden crecer igualmente utilizando como única fuente de carbono la glutamina (Wellen *et al.*, 2010; Mullen *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014). Tal como se muestra en la Figura 9, la glutamina puede ser destinada a la síntesis de citrato. La glutamina es convertida en glutamato por la GLS. El glutamato es transportado hasta la matriz mitocondrial, donde es oxidado por la glutamato deshidrogenasa (GDH) para dar lugar a 2-oxoglutarato (2-OG). El 2-OG puede ser incorporado al ciclo de Krebs, para asegurar la síntesis de sus intermediarios y mantener su funcionamiento, o descarboxilado y reducido por la isocitrato deshidrogenasa (IDH1). El isocitrato resultante puede ser transformado en citrato, que finalmente es convertido por la enzima ACLY en acetyl-CoA (Lunt and Vander Heiden, 2011; Matés *et al.*, 2019). Mientras que en el primer caso la glutamina es utilizada en una ruta anaplerótica, en el segundo es utilizada para sintetizar citrato citoplasmático. Con el objetivo de evaluar la posibilidad de que la glutamina también fuese destinada a la síntesis de acetyl-CoA y en consecuencia a la síntesis de lípidos se analizó la incorporación de glutamina marcada radioactivamente en neuronas estimuladas o no con Bic + 4-

AP. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia en los niveles de radioactividad entre los lípidos de cultivos sinápticamente estimulados y los de los cultivos en reposo (Figura 21 B).

8.1.3 La actividad sináptica incrementa la síntesis de acetil-CoA a partir de la glucosa.

Tras su paso por la glucólisis, una molécula de glucosa da lugar a dos moléculas de piruvato que, tras ser transportado al interior de la mitocondria, puede ser descarboxilado por el complejo PDH para formar acetil-CoA. Este último puede ser combinado con el oxalacetato para dar lugar a una molécula de citrato, que puede ser incorporado al ciclo de Krebs o transportado hasta el citoplasma para ser convertido de nuevo en acetil-CoA gracias a la acción de la ACLY. Finalmente, el acetil-CoA citoplasmático puede ser utilizado en la síntesis de lípidos o en la acetilación de proteínas (Pietrocola *et al.*, 2015). Como puede comprobarse en la Figura 22 A, los niveles de acetil-CoA de cultivos neuronales estimulados durante un periodo de 24 horas se incrementaron. Sin embargo, no se observó cambio alguno en los niveles de CoA (Figura 22 B). Por lo tanto, los cambios promovidos por la actividad sináptica afectan esencialmente a la síntesis del grupo acetilo.

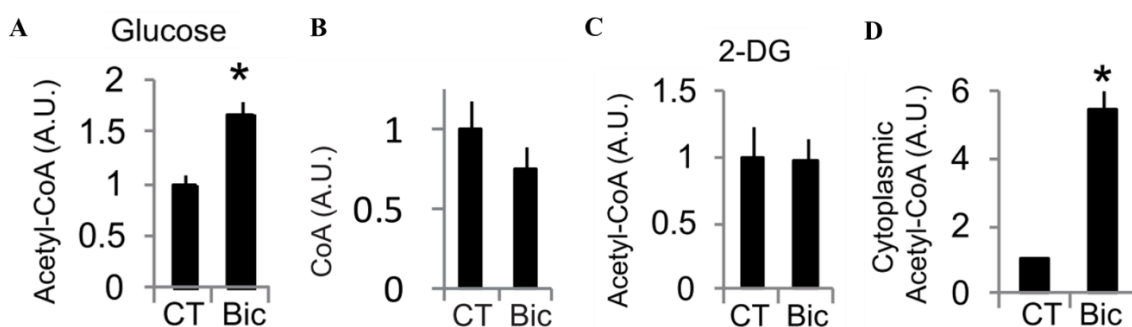


Figura 22: La actividad sináptica incrementa la síntesis de acetil-CoA a partir de la glucosa. A) Las neuronas corticales fueron estimuladas durante 24 horas con Bic + 4-AP en presencia de glucosa. Tras 24 horas se analizaron los niveles de acetil-CoA. n=8 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. B) Determinación de los niveles de CoA tras 24 horas de estimulación con Bic + 4-AP. n=4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. C) Determinación de los niveles de acetil-CoA citosólico tras 24 horas de estimulación en presencia del análogo no metabolizable de la glucosa 2-DG a una concentración final de 25mM. n=4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. D) Determinación de los niveles de acetil-CoA citosólico tras 24 horas de estimulación en presencia de glucosa. n=4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas.

El incremento en los niveles de acetil-CoA depende del metabolismo de la glucosa, ya que en presencia de la 2-deoxiglucosa (2-DG), un inhibidor de la glucólisis, no se observaron diferencias significativas en los niveles de acetil-CoA (Figura 22 C). Dado que el acetil-CoA utilizado en la síntesis de lípidos es el citoplasmático, siendo el mitocondrial destinado principalmente a

alimentar el ciclo de Krebs, se decidió analizar únicamente los niveles en el citoplasma. En este caso, el incremento fue todavía superior (Figura 22 D).

Como se ha comentado previamente, el acetil-CoA citoplasmático es sintetizado principalmente por la ACLY. Por lo tanto, se analizó la incorporación de glucosa tras inhibir la expresión de esta enzima. Para esto, se diseñó un shRNA capaz de reducir la expresión de esta proteína (sh-ACLY; Figura 23 A, B). De acuerdo con los resultados expuestos anteriormente, en las neuronas estimuladas y transducidas con este shRNA se observó una reducción en los niveles de glucosa incorporada en lípidos (Figura 23 C).

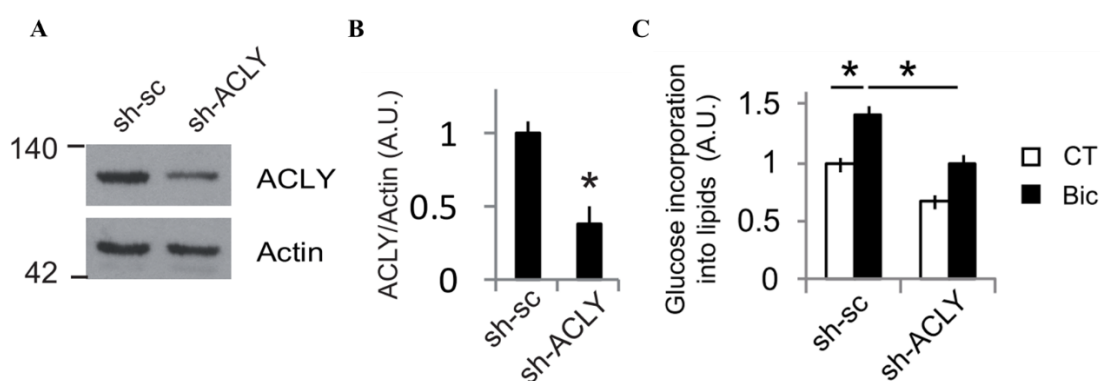


Figura 23: La enzima ACLY juega un papel clave en la síntesis de lípidos a partir de glucosa promovida por la actividad sináptica. A) Análisis por Western blot de los extractos de proteína de neuronas corticales transducidas con AAVs que expresan un shRNA control (sh-sc) o contra ACLY (sh-ACLY). B) Densitometría del Western blot anterior. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. C) Neuronas transducidas con AAV-sh-ACLY o AAV-sh-sc (control), incubadas con ^{14}C -U-glucosa y estimuladas o no con Bic+4-AP durante 48 horas (CT). n=7 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test post hoc de Tukey.

8.1.4 La glucosa es necesaria para el crecimiento axonal.

Tal como se ha mostrado, las neuronas estimuladas utilizan la glucosa para la síntesis de nuevos lípidos. Por lo tanto, el siguiente paso fue corroborar si efectivamente la glucosa era o no necesaria para la generación de nuevas membranas destinadas al crecimiento neurítico. En primer lugar, se corroboró que en el modelo utilizado en este estudio la actividad sináptica es capaz de promover el crecimiento neuronal. Para ello los cultivos primarios de neuronas corticales se transfectaron con la proteína fluorescente GFP. De forma que, tras fijar los cultivos y amplificar su señal mediante inmunofluorescencia, con la ayuda de un microscopio de fluorescencia se pueden trazar las extensiones neuríticas de las diferentes neuronas transfectadas. En el análisis se tuvieron en cuenta tanto la longitud total de todas las extensiones como la longitud de dendritas y axones por separado.

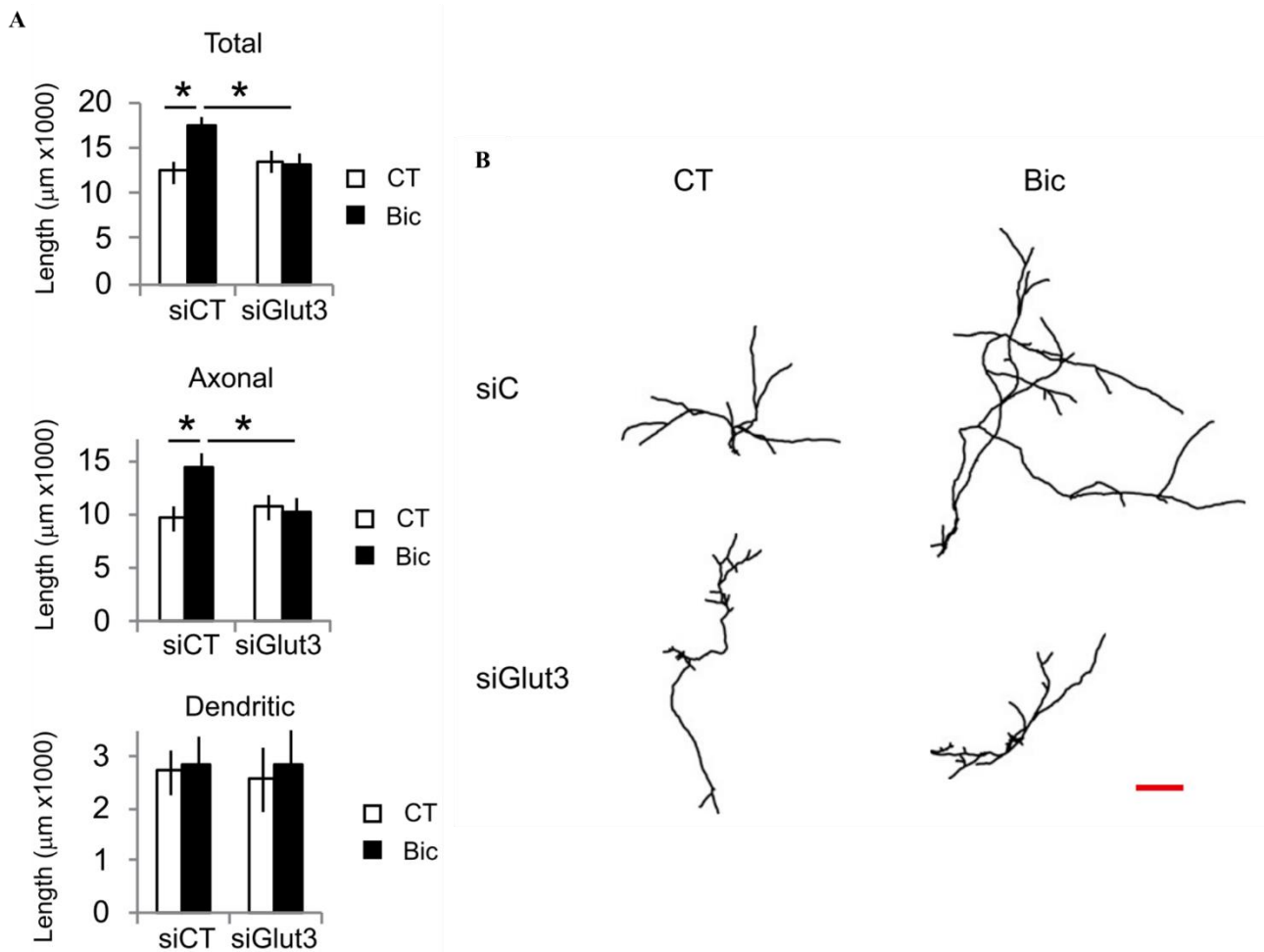


Figura 24: La glucosa es necesaria para el crecimiento axonal. A) Longitud neurítica total, de axones y de dendritas del árbol neurítico de neuronas control o estimuladas con Bic + 4-AP durante un periodo de 48h tras ser transfectadas con un pool de 4 de siRNAs control (siCT) o con un pool de 4 siRNA contra el transportador de glucosa Glut3 (siGlut3). n=45-49 neuronas de nueve experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. B) Trazos representativos del análisis de la longitud neurítica mostrado anteriormente. Barra de escala: 500µm.

La estimulación de la actividad sináptica durante un período de 48 horas incrementó significativamente la longitud total de las neuritas y de los axones por separado, pero no de las dendritas (Figura 24 A, B). Esto podría ser debido a la existencia de diferentes clases neuronales en la corteza con conformaciones y morfologías diferentes a nivel del árbol dendrítico.

Para confirmar si efectivamente la glucosa es necesaria para el crecimiento neuronal se transfectaron las neuronas con un pool de 4 siRNAs diferentes (Dharmacon) contra Glut3, el principal transportador de glucosa en neuronas (Szablewski, 2017). La reducción en la expresión de este transportador inhibió el crecimiento total y axonal en neuronas estimuladas (Figura 24 A, B).

De acuerdo con estos resultados, la inhibición tanto del metabolismo de la glucosa, mediante el tratamiento con 2-DG, y la inhibición de la expresión de ACLY, también reducen el crecimiento neuronal en las neuronas estimuladas sinápticamente. Por lo tanto, es posible concluir que la actividad sináptica utiliza la glucosa como fuente de carbono para la síntesis de los lípidos necesarios para la formación de las nuevas membranas necesarias para el crecimiento neuronal.

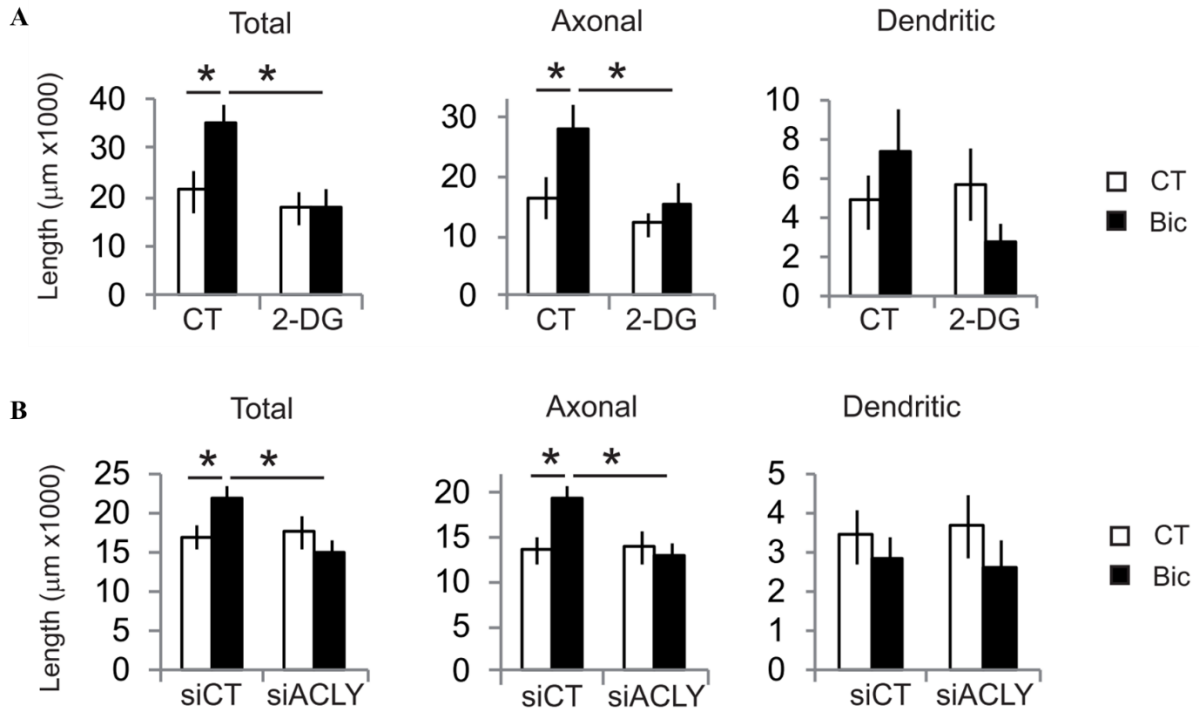


Figura 25: La glucosa es necesaria para el crecimiento axonal. A) Longitud neurítica total, de axones y de dendritas del árbol neurítico de neuronas control o estimuladas con Bic + 4-AP durante un periodo de 48h cultivadas en presencia o no del análogo no metabolizable de la glucosa 2-DG a una concentración final de 25mM. n=15 neuronas de tres experimentos independientes. Los valores representan la media ± e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. B) Longitud neurítica total, de axones y de dendritas del árbol neurítico de neuronas control o estimuladas con Bic + 4-AP durante un periodo de 48h tras ser transfectadas con un siRNA control (siCT) o un siRNA contra la enzima ACLY (siACLY). n=27-40 neuronas de seis experimentos independientes. Los valores representan la media ± e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey.

8.2 La actividad sináptica estimula tanto la captación como el metabolismo de la glucosa a nivel transcripcional.

8.2.1 La actividad sináptica promueve la captación de glucosa por las neuronas.

El incremento en la síntesis de lípidos a partir de la glucosa deberá ir acompañado de un incremento del consumo de la última. Por lo tanto, se comprobó si existen diferencias a nivel del transporte de glucosa entre neuronas estimuladas y no estimuladas. Para ello, tras 24 horas de estimulación, se llevó a cabo el lavado del medio para asegurar la completa eliminación del

tratamiento con Bic+4-AP. A continuación, los cultivos se incubaron durante 30 minutos con el objetivo que los gradientes de iones, implicados en la respuesta sináptica, se equilibraran y no afectaran al análisis de captación de glucosa.

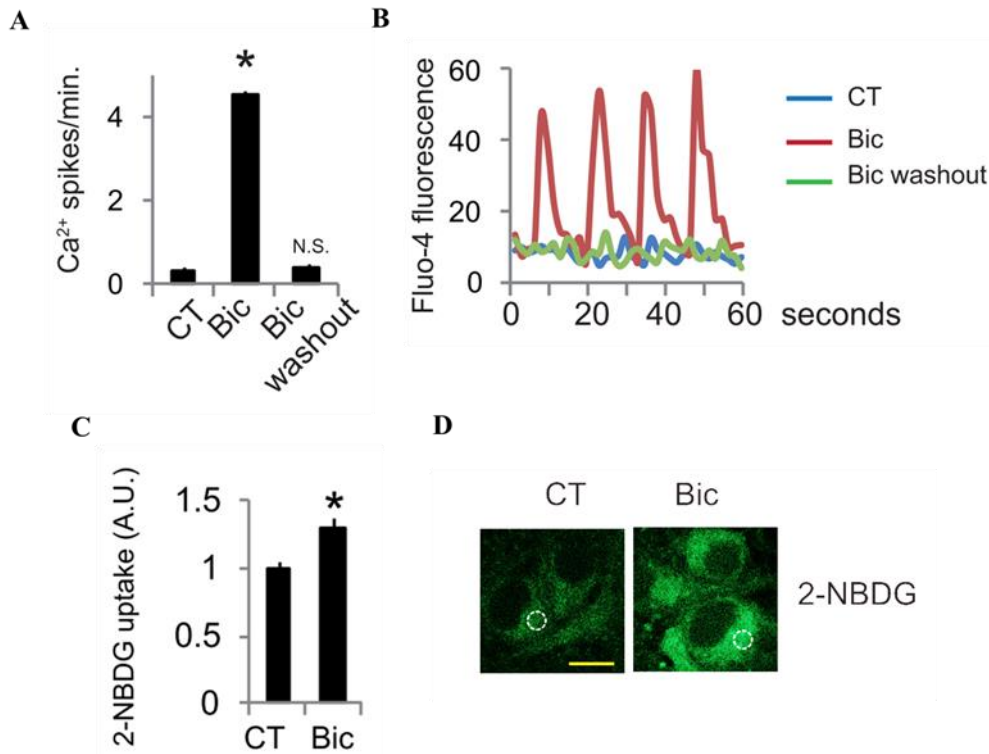


Figura 26: La actividad sináptica promueve la captación de glucosa por las neuronas. A) Determinación de los picos de Ca²⁺ mediante Fluo-4 de neuronas no estimuladas, tras ser estimuladas durante 1 minuto o tras ser estimuladas 24 horas e incubadas tras 30 minutos tras realizar un lavado. n=30 neuronas de tres experimentos independientes. Los valores representan la media ± e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. B) Gráfico representativo de los cambios en la señal de Fluo-4 para las diferentes condiciones estudiadas en A. C) Captación de 2-NBDG tras 15 minutos en neuronas control o estimuladas con Bic + 4-AP durante 24 horas tras llevar a cabo un lavado y un cambio de medio. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media ± e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. D) Imágenes representativas de la captación de 2-NBDG. Barra de escala: 5µm.

En el análisis de los niveles de Ca²⁺ llevado a cabo por Sergi Casellas (Figura 26 A, B) el lavado del tratamiento con Bic+4-AP bloquea de forma efectiva la repetida sucesión de potenciales de acción inducida por la estimulación con Bic + 4-AP. La medida de la captación de la glucosa se llevó a cabo mediante la utilización de un análogo fluorescente de la glucosa: la sonda 2-NBDG. Las neuronas estimuladas previamente durante un periodo de 24 horas emitían un mayor nivel de fluorescencia, lo que se traduce en una mayor captación de glucosa (Figura 26 C, D).

8.2.2 La actividad sináptica estimula el flujo glucolítico en las neuronas.

Una parte del piruvato producido por la glucólisis es convertido en lactato en una reacción, catalizada por la LDH, necesaria para la regeneración del NAD^+ consumido por la glucólisis. La glucólisis es la principal fuente de lactato en la célula, en función del tipo celular, puede ser la responsable de la producción de entre el 82 y el 90% del lactato (W. Zhang *et al.*, 2017). Como consecuencia, la liberación de lactato al medio ha sido comúnmente utilizada como una representación de la actividad glucolítica (Teslaa and Teitell, 2014). Tras 24 horas de estimulación, se observó un marcado incremento en la liberación de lactato. En el medio de las neuronas estimuladas se detectó aproximadamente el doble de lactato que en el de las no estimuladas (Figura 27 A).

Como se observa en la Figura 8, a partir de la vía no oxidativa de la PPP puede generarse gliceraldehido-3-fosfato, que a continuación puede incorporarse directamente en la glucólisis a partir de la reacción de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Tal como mostraron Herrero-Méndez y colaboradores, la enzima PFKFB3, la enzima encargada de la regulación de una de las enzimas limitantes de la glucólisis, es constantemente degradada en neuronas (Herrero-Mendez *et al.*, 2009). Teniendo este resultado en cuenta, cabría la posibilidad de que el incremento en la liberación de lactato fuese debido al incremento en el flujo de glucosa a través de la PPP y su posterior reincorporación a nivel del gliceraldehido-3-fosfato. Para corroborar si el incremento en el consumo de glucosa era debido a la glucólisis a la PPP se incubaron las neuronas en presencia de 3-PO, un inhibidor de la PFKFB3. La inhibición de esta enzima en neuronas estimuladas causó una reducción significativa en la liberación de lactato al medio (Figura 27 A). Este resultado sugiere que la actividad promueve el consumo de glucosa principalmente a través de la glucólisis y además que la enzima PFKFB3 juega un papel esencial en la activación de la glucólisis por la estimulación sináptica.

El medio de cultivo utilizado es un medio hiperglicémico, con una concentración de glucosa alrededor de 30mM. Esta elevada concentración podría estar obligando de alguna forma a las neuronas a recurrir a la glucólisis como fuente de carbono y energía. Sin embargo, en un medio con una concentración de 2.4mM, la concentración fisiológica de glucosa en el cerebro (Silver and Erecińska, 1994), se observó el mismo efecto (Figura 27 B).

Para acabar de confirmar que la estimulación sináptica activa la glucólisis se realizó un tercer experimento basado en la síntesis de ATP. Tal como se muestra en el cronograma de la Figura 27 C, tras una estimulación de 24 horas, se llevó a cabo un lavado del medio durante 30 minutos con el objetivo de que los gradientes iónicos se recuperaran. A continuación, se desacoplaron las mitocondrias mediante la incubación de los cultivos en presencia de CCCP. Esto redujo claramente los niveles de ATP. Sin embargo, en las neuronas previamente estimuladas la caída

fue menor. Este efecto tan solo se observó en presencia de glucosa (Figura 27 C). Por lo tanto, este resultado confirma que las neuronas estimuladas tienen una mayor actividad glicolítica que les permite sintetizar más ATP que las no estimuladas cuando se desacoplan las mitocondrias.

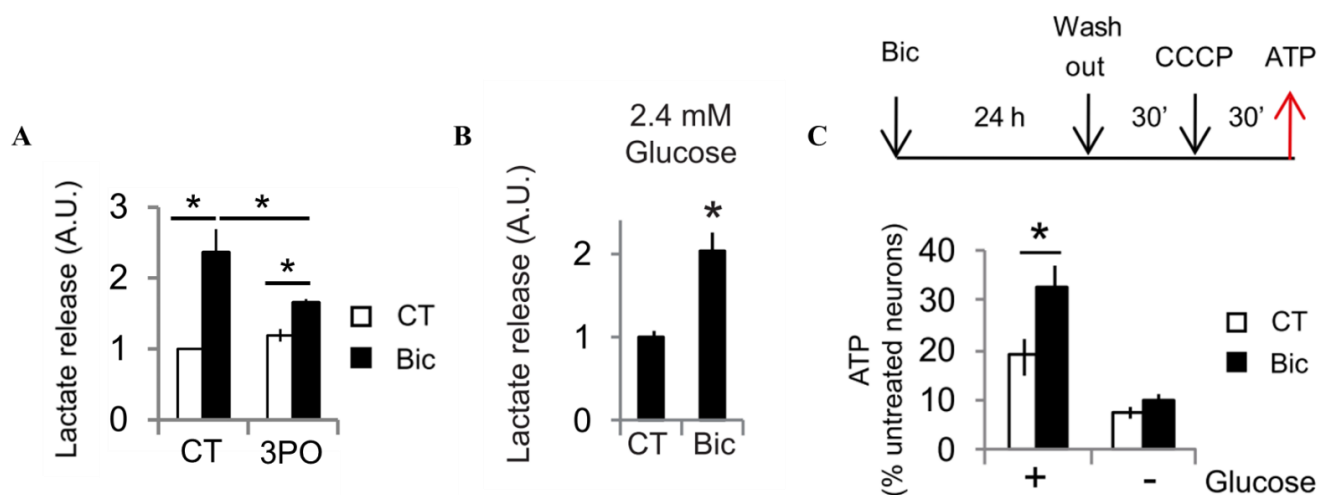


Figura 27: La actividad sináptica estimula el flujo glicolítico en las neuronas. Las neuronas tratadas o no con 3-PO (25mM) fueron estimuladas o no durante 24 horas antes de llevar a cabo la mediada de la cantidad de lactato liberado en el medio. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. B) Lactato liberado al medio en neuronas estimuladas o no con Bic + 4-AP durante 24 horas en un medio con glucosa a una concentración de 2.4mM. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. C) Niveles de ATP de neuronas estimuladas o no durante 24 horas tratadas con CCCP (3nM) de acuerdo con el cronograma mostrado en la parte superior. + y - hace referencia a la presencia o ausencia de glucosa en el medio añadido tras el paso del lavado del medio. n= 3-6 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey.

Con el objetivo de determinar si antes de ser incorporada en lípidos la glucosa es metabolizada a través de la glucólisis, se repitió el análisis de incorporación de glucosa en lípidos, pero esta vez inhibiendo la glucólisis de forma específica. Para ello se redujo la expresión de la glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI, por sus siglas en inglés), la enzima que cataliza la segunda reacción de la glucólisis, la conversión de glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato (Figura 8). Con esta finalidad se utilizó un shRNA específico contra esta proteína (shGPI). Para la transducción de este shRNA y del shRNA control (shSC) se recurrió a la transducción mediante AVVs. Tal como se muestra en la Figura 28 A, la expresión del shGPI en neuronas reducía la expresión de GPI prácticamente al completo. Tras reducir la expresión de GPI en neuronas estimuladas se observó una clara reducción en la incorporación de glucosa en lípidos (Figura 28 B). Por lo tanto, puede afirmarse que la glucosa incorporada en lípidos es previamente metabolizada en la glucólisis.

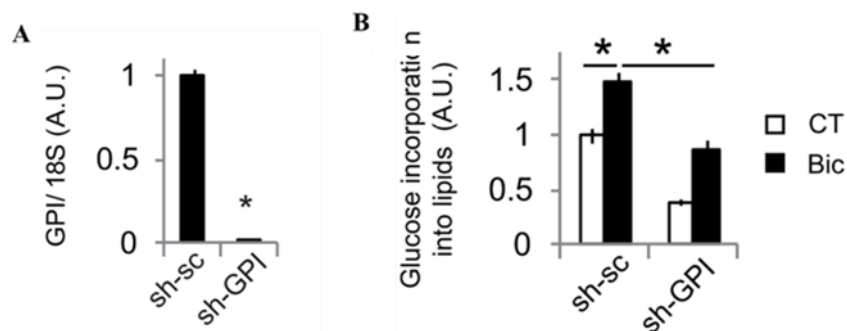


Figura 28: La glucosa incorporada en lípidos es previamente metabolizada en la glucólisis. A) Niveles de mRNA de GPI analizados por qPCR de neuronas corticales transducidas con AAVs que expresan un shRNA control (sh-sc) o contra GPI (shGPI). n=4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. B) Neuronas transducidas con AAV-shGPI o AAV-sh-sc (control), incubadas con ¹⁴C-U-glucosa y estimuladas o no con Bic+4-AP durante 48 horas (CT). Tras este período de tiempo se aislaron los lípidos de los cultivos de cada condición y se cuantificó su nivel de radioactividad. El valor se normalizó por la cantidad de proteína total. n=7 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey.

8.2.3 La actividad sináptica estimula la expresión de genes implicados en el transporte y el metabolismo de la glucosa.

La actividad sináptica puede promover la translocación de Glut3 en la membrana plasmática (Ferreira, Burnett and Rameau, 2011). También está implicada en la regulación de diferentes programas de expresión génica (Cohen and Greenberg, 2008; Bading, 2013). Por lo tanto, se decidió estudiar si la actividad sináptica regulaba la glucólisis a nivel postraduccional o a nivel transcripcional. La cicloheximida (CHX) es un inhibidor de la traducción del mRNA. En el caso de que el metabolismo de la glucosa fuese activado a nivel postranscripcional, no se vería afectado por el tratamiento con CHX, por el contrario, en el caso de que esta activación dependiera de la síntesis de nuevas proteínas sí que se vería afectado. Tal como se observa en la Figura 29 A, el tratamiento con CHX inhibió la activación del metabolismo de la glucosa en neuronas estimuladas durante 24 horas.

La incubación prolongada de los cultivos primarios de neuronas en presencia de CHX puede causar la mortalidad de las neuronas. Como consecuencia, el metabolismo, y por lo tanto la liberación de lactato, podría verse afectado. Sin embargo, no se observó ningún cambio en la viabilidad neuronal como consecuencia del tratamiento con CHX (Figura 29 B). Estos resultados demuestran que la actividad sináptica induce el metabolismo de la glucosa mediante un mecanismo que requiere la síntesis de nuevas proteínas.

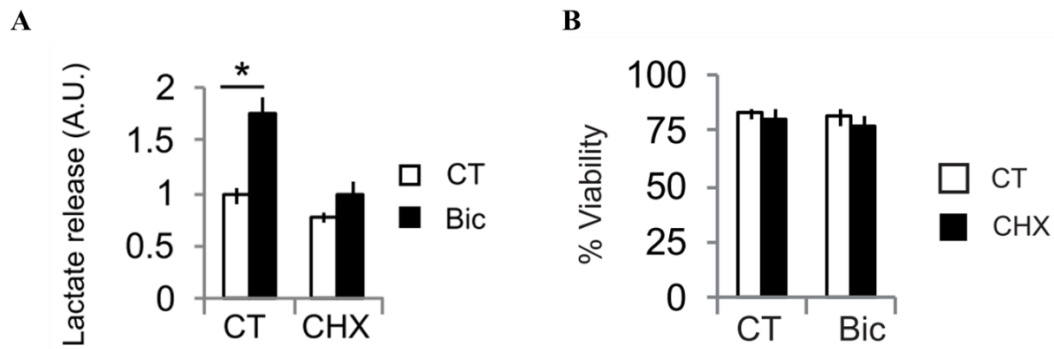


Figura 29: La actividad sináptica induce el metabolismo de la glucosa mediante un mecanismo que requiere la síntesis de nuevas proteínas. A) Las neuronas tratadas o no con CHX (10 μ M) fueron estimuladas o no durante 24 horas antes de llevar a cabo la mediada de la cantidad de lactato liberado en el medio. n= 4-7 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * p <0,05, ANOVA de un factor seguido por el test post hoc de Tukey. B) Viabilidad neuronal en neuronas tratadas o no con CHX (10 μ M) y estimuladas o no durante 24 horas. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * p <0,05, ANOVA de un factor seguido por el test post hoc de Tukey.

Para comprobar si la activación del metabolismo de la glucosa es debido a un cambio a nivel transcripcional se analizaron por qPCR los niveles de expresión de Glut3, el principal transportador de glucosa en neuronas; de HK2, PFK y PKM, las tres enzimas limitantes de la glucólisis; y por último de PFKFB3, la enzima que cataliza la síntesis de la fructosa-2,6-bifosfato, el principal activador alostérico de PFK en neuronas estimuladas durante 4 y 24 horas. Como resultado se observó un incremento en los niveles de expresión de todos los genes a excepción de PFK (Figura 30 A).

Curiosamente, el patrón de expresión de Glut3 es diferente al del resto de genes sobreexpresados. Mientras que la expresión del primero se dispara tras 4 horas de estimulación y luego se reduce parcialmente, la expresión de los últimos se incrementa tras 4 horas y luego se mantiene hasta las 24 horas. Este incremento a nivel transcripcional se confirmó también a nivel de proteína (Figura 30 B, C). Hasta este punto, los resultados obtenidos demuestran que la actividad sináptica estimula el metabolismo de la glucosa a nivel transcripcional.

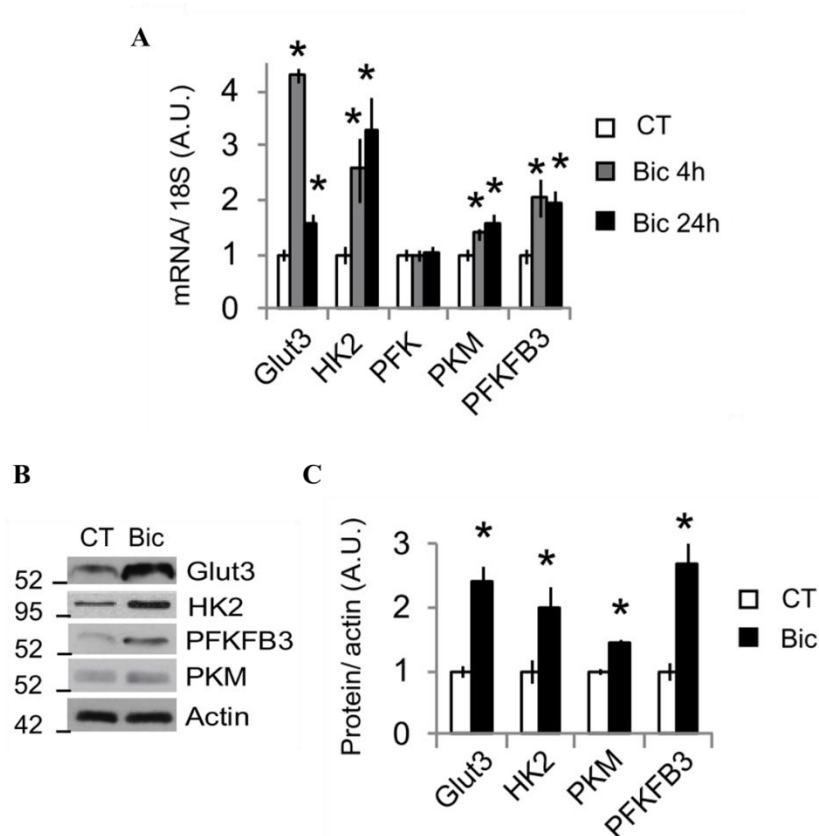


Figura 30: La actividad sináptica estimula el metabolismo de la glucosa a nivel transcripcional. A) Las neuronas corticales se estimularon o no con Bic + 4-AP durante 4 y 24 horas. Pasado este periodo de tiempo la expresión de mRNA de los genes indicados se determinó por qPCR. n= 3-6 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. B) Análisis por Western blot de los extractos de proteína de neuronas corticales estimuladas con Bic + 4-AP durante 24 horas. C) Densitometría del Western blot anterior. n= 3-4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas.

El gen de PKM da lugar por *splicing* alternativo a dos isoformas diferentes PKM1 y PKM2. Tal como se observa en la Figura 31 A, ambas isoformas se diferencian en la presencia de un exón distinto, siendo el exón 9 el propio de PKM1 y el 10 de PKM2 (Noguchi, Inoue and Tanaka, 1986). Cada isoforma es específica de un tejido diferente. Mientras que PKM1 se expresa en la mayoría de tejidos adultos, PKM2 se expresa principalmente en tejidos embrionarios, siendo característica de células con una elevada tasa de proliferación (Lunt and Vander Heiden, 2011). El cambio en la expresión de PKM1 por PKM2 es característico de células que experimentan un cambio de un metabolismo oxidativo a uno glicolítico, como en el caso de las células tumorogénicas (Christofk *et al.*, 2008). En el análisis previo de la expresión génica de PKM de las neuronas estimuladas (Figura 30 A) se utilizó una pareja de *primers* que abarcaba los exones 2 y 3. Común a ambas isoformas. Por lo tanto, se planteó la idea de si este incremento podía ser debido la sobreexpresión de una de las dos isoformas sobre la otra. Para ello se diseñaron dos nuevas parejas de *primers*, una dirigida a los exones 8 y 9, para PKM1, y otra dirigida a los exones

8 y 10, para PKM2. Sorprendentemente, se observó un incremento en la expresión de ambas isoformas (Figura 31, B).

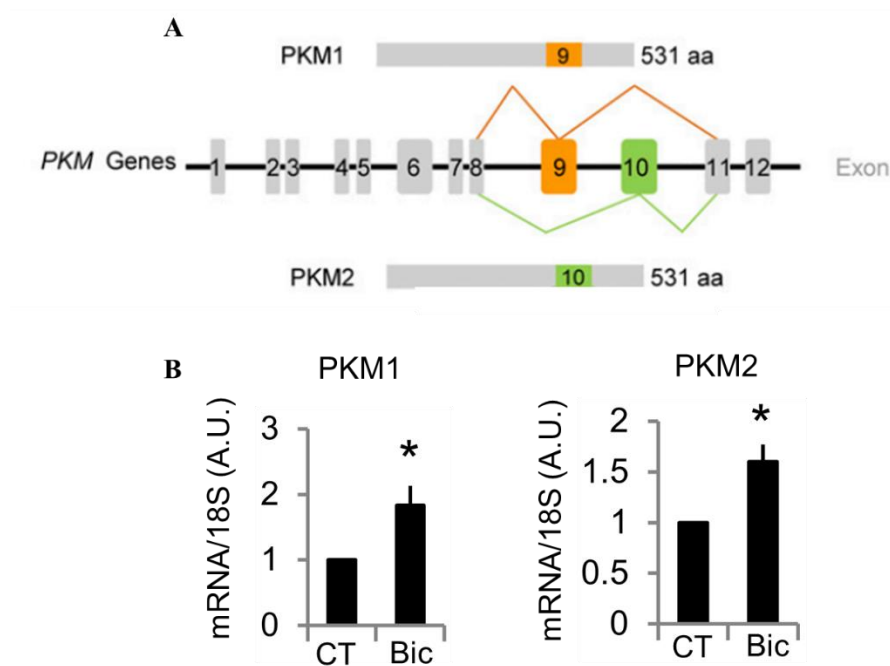


Figura 31: La actividad sináptica estimula la expresión por igual de las dos isoformas de PKM. A) Representación esquemática del gen PKM y de sus diferentes exones. La expresión de PKM1 y PKM2 tiene lugar por *splicing* alternativo. Ambas isoformas comparten los mismos exones a excepción del exón 9, presente únicamente en PKM1, y del 10, presente únicamente en PKM2. Imagen adaptada (Wang *et al.*, 2017). B) Las neuronas corticales se estimularon o no con Bic + 4-AP durante 24 horas. Pasado este periodo de tiempo la expresión de mRNA de los genes indicados se determinó por qPCR. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media ± e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas.

8.2.4 El factor de crecimiento BDNF también estimula la actividad glicolítica a nivel transcripcional.

BDNF es un factor neurotrófico ampliamente relacionado con la regulación de la diferenciación y del crecimiento neuronal, cuya síntesis es inducida por la actividad sináptica (Park and Poo, 2013; Kowiański *et al.*, 2018). Se ha comprobado que el tratamiento con BDNF puede estimular el crecimiento dendrítico tanto en neuronas corticales en cultivos organotípicos de secciones cerebrales como en cultivos primarios de neuronas de hipocampo (McAllister, Katz and Lo, 1996; Bartrup, Moorman and Newberry, 1997). Por lo tanto, del mismo modo en que la actividad sináptica promueve el metabolismo de la glucosa para fomentar la síntesis de los lípidos necesarios para el crecimiento neuronal, el BDNF debería causar el mismo efecto. Tras cultivar las neuronas corticales en presencia de BDNF durante 4 y 24 horas también se observó un incremento en la expresión de los genes del metabolismo de la glucosa analizados previamente junto con un mayor nivel de captación de glucosa y de liberación de lactato al medio (Figura 32

A-C). No obstante, a partir de estos resultados no es posible descartar que esto sea debido a un efecto indirecto a causa de la estimulación de la actividad sináptica por el BDNF (Li *et al.*, 1998).

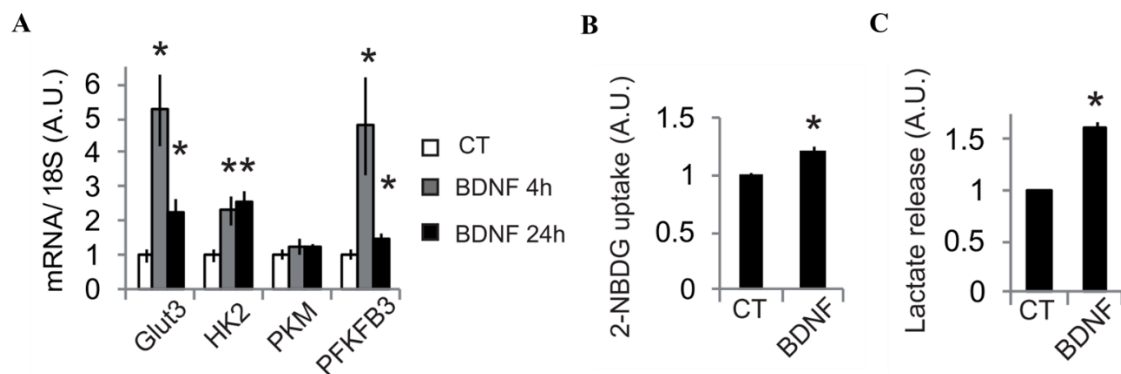


Figura 32: El factor de crecimiento BDNF también estimula la actividad glicolítica a nivel transcripcional. A) Las neuronas corticales se estimularon o no con BDNF (25 ng/ml) durante 4 y 24 horas. Pasado este periodo de tiempo la expresión de mRNA de los genes indicados se determinó por qPCR. n= 3-6 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. B) Captación de 2-NBDG tras 15 minutos de incubación en neuronas control o estimuladas con BDNF (25 ng/ml) durante 24 horas tras llevar a cabo un lavado y un cambio de medio. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. C) Las neuronas fueron estimuladas o no con BDNF (25 ng/ml) durante 24 horas antes de llevar a cabo la mediada de la cantidad de lactato liberado en el medio. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas.

8.2.5 La activación del metabolismo de la glucosa tiene lugar en las neuronas estimuladas.

El metabolismo neuronal y glial están estrechamente acoplados (Bélanger, Allaman and Magistretti, 2011). Tras analizar por inmunocitofluorescencia los marcadores NeuN, específico de neuronas, y GFAP, específico de astrocitos, se comprobó que alrededor del 2% de las células de los cultivos primarios utilizados en este estudio son astrocitos (Figura 33 A, B). A pesar de que los experimentos para analizar el transporte de glucosa fueron analizados por microscopía, los experimentos de liberación de lactato y de generación de ATP fueron llevados a cabo con la ayuda de un espectrofotómetro/luminómetro y por lo tanto en este caso es imposible discernir si los cambios observados ocurren en neuronas o en células gliales. Por lo tanto, no es posible descartar la posibilidad de que la activación de la glucólisis por la estimulación sináptica ocurra en las células de gliales y no en las neuronas. Para comprobarlo se utilizaron dos estrategias diferentes.

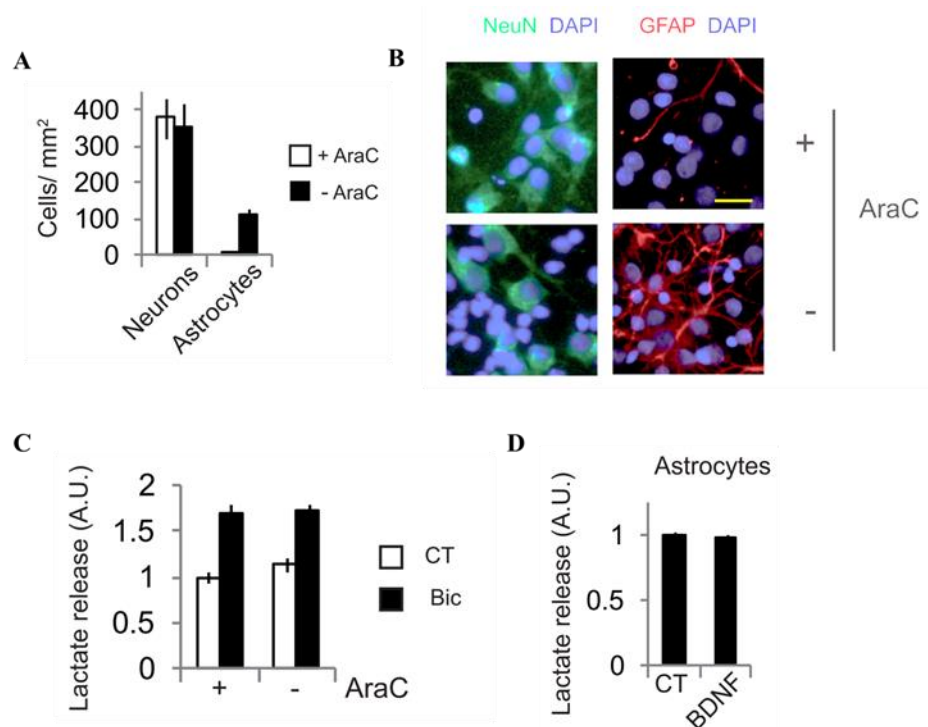


Figura 33: La activación del metabolismo de la glucosa tiene lugar en las neuronas estimuladas. A) Cuantificación de del contenido de neuronas y astrocitos en cultivos corticales mixtos tratados o no con AraC a DIV4. n= 3 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. B) Imágenes de inmunocitofluorescencia de las proteínas indicadas en los cultivos corticales mixtos tratados o no con AraC a DIV4. Barra de escala: 25 μ m. C) Liberación de lactato tras 24 horas de estimulación con Bic + 4-AP de cultivos corticales mixtos con diferentes proporciones de astrocitos. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * p <0,05, ANOVA de un factor seguido por el test post hoc de Tukey. D) Liberación de lactato al medio de cultivos puros de astrocitos tratados durante 24 horas con BDNF (25 ng/ml). n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * p <0,05, prueba t de Student de dos colas.

Durante el proceso de preparación de los cultivos primarios de neuronas se lleva a cabo un tratamiento con el inhibidor de la mitosis AraC con el objetivo de inhibir la proliferación de las células gliales y por lo tanto obtener cultivos enriquecidos en neuronas. La primera estrategia consistió en obtener cultivos con diferentes proporciones de glía para comparar los niveles de liberación de lactato tras estimularlos. En el caso de que el incremento en la liberación de lactato en los cultivos estimulados fuese debido a cambios en la expresión génica en células gliales en lugar de en neuronas el aumento de la cantidad de células gliales en el co-cultivo debería causar un incremento en la liberación de lactato tras la estimulación. Para ello, se prepararon dos cultivos diferentes, uno tratado con AraC a DIV4 y otro no tratado con AraC. Tal como se observa en la Figura 33 A, B, los cultivos crecidos en ausencia de AraC presentaban un mayor número de astrocitos. Aunque estos cultivos tenían alrededor de 10 veces más astrocitos que los tratados con AraC, ambos cultivos experimentaron el mismo incremento en la liberación de lactato tras ser estimulados (Figura 33 C). Este resultado sugiere que el incremento en el metabolismo de la glucosa ocurre principalmente en las neuronas y no en los astrocitos.

La segunda estrategia consistió en estimular cultivos puros de astrocitos. Los astrocitos expresan receptores TrkB funcionales (Rose *et al.*, 2003; Ohira *et al.*, 2005). Sin embargo, el tratamiento con BDNF de cultivos puros de astrocitos no incrementó la liberación de lactato al medio en los mismos (Figura 32 C, Figura 33 D), confirmando que la activación del metabolismo de la glucosa tiene lugar en las neuronas estimuladas y no en astrocitos.

8.3 La actividad sináptica estimula la glucólisis mediante la estabilización de HIF-1 α .

8.3.1 La actividad sináptica estabiliza HIF-1 α en normoxia.

Teniendo en cuenta que la actividad sináptica estimula el metabolismo de la glucosa a nivel transcripcional, el siguiente paso fue determinar qué factor de transcripción podía ser el responsable.

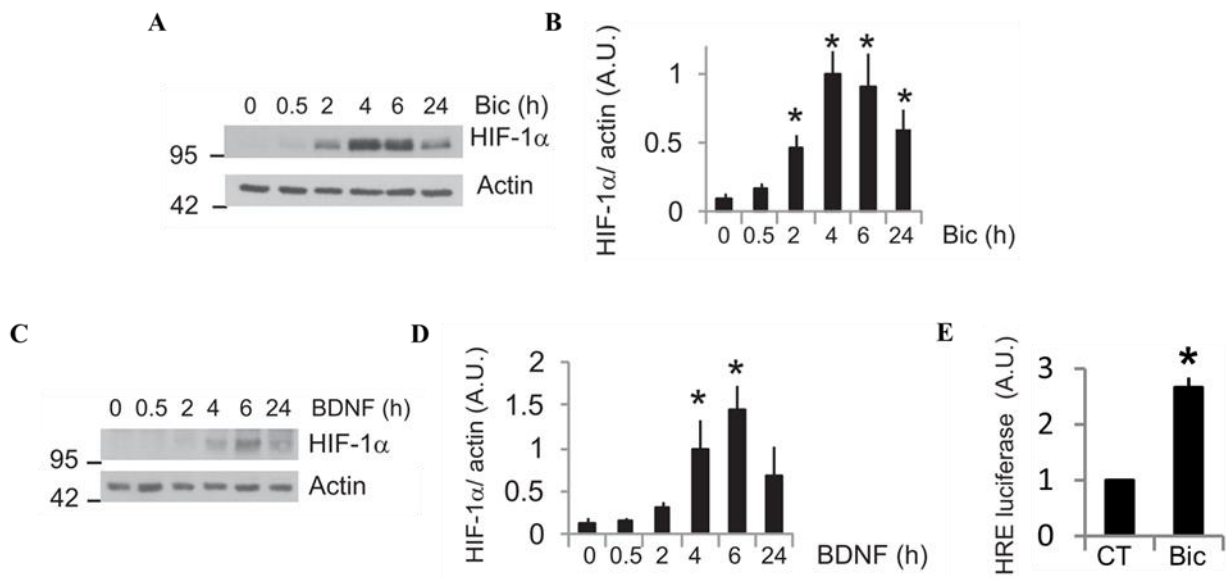


Figura 34: La actividad sináptica y el factor de crecimiento BDNF estabilizan HIF-1 α en normoxia. A) Las neuronas corticales fueron estimuladas con Bic + 4-AP durante los periodos de tiempo indicados y los niveles de HIF-1 α se analizaron por *Western blot*. n= 5 experimentos independientes. B) Densitometría del *Western blot* anterior. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. C) Las neuronas corticales fueron tratadas con BDNF (25ng/ml) durante los periodos de tiempo indicados y los niveles de HIF-1 α se analizaron por *Western blot*. n= 5 experimentos independientes. D) Densitometría del *Western blot* anterior. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. E) Análisis mediante el gen reportero de luciferasa de la actividad transcripcional de HIF-1 α tras 8 horas de estimulación de los cultivos neuronales con Bic + 4-AP. n= 12 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas.

HIF-1 α es un factor de transcripción que estimula la glucólisis activando la transcripción de los genes implicados en la misma y en el transporte de glucosa como respuesta a un episodio de hipoxia (Semenza *et al.*, 1994; Denko, 2008). Aunque en HIF-1 α suele ser degradado en normoxia, determinadas condiciones pueden permitir su estabilización en presencia de oxígeno (Denko, 2008). Por lo tanto, HIF-1 α podría ser el responsable de la activación de los genes del metabolismo de la glucosa en las neuronas estimuladas sinápticamente.

Tal como se observan en los *Western blots* llevados a cabo por Sergi Casellas (Figura 34 A-D), tanto la estimulación sináptica como el tratamiento con BDNF de cultivos primarios neuronales promovió la estabilización de HIF-1 α . Aunque en el primer caso parece que tuvo lugar antes, en ambos casos la estabilización de HIF- α puede detectarse entre 2 y 4 horas, desde el inicio de los tratamientos. El incremento en los niveles de HIF-1 α se corresponde con un aumento de su actividad transcripcional, tal y como se observó tras llevar a cabo un análisis de la actividad transcripcional de HIF-1 α con el gen reportero de la luciferasa bajo el control de la secuencia HRE, la secuencia de unión de HIF-1 α al DNA (Figura 34 E). Por lo tanto, es posible afirmar que la actividad sináptica promueve la estabilización de HIF-1 α y su consecuente activación.

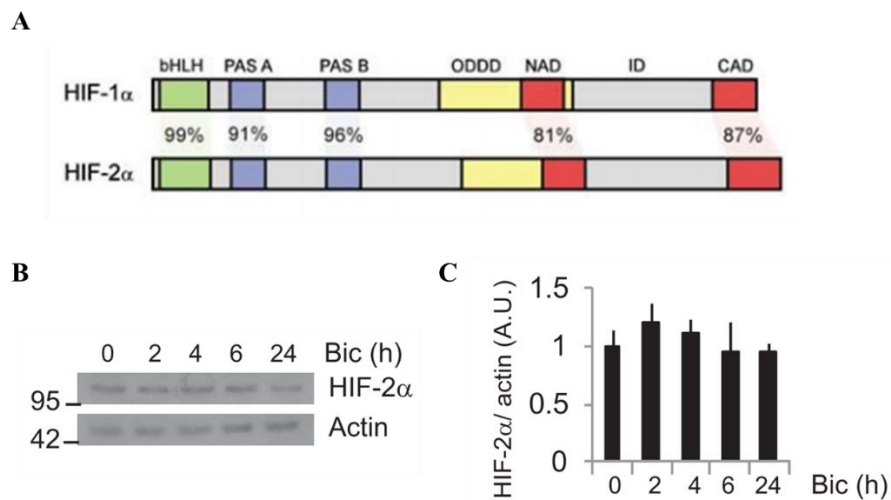


Figura 35: La actividad sináptica no estabiliza a HIF-2 α en normoxia. A) Esquema de los dominios presentes en la estructura de los parálogos HIF-1 α y HIF-2 α . Los valores numéricos hacen referencia al nivel de similitud entre las secuencias de aminoácidos de cada dominio entre las formas humanas de ambas proteínas. Imagen adaptada (Lisy and Peet, 2008). B) Las neuronas fueron estimuladas con Bic + 4-AP durante los periodos de tiempo indicados y a continuación se analizó el nivel de proteína de HIF-2 α por *Western blot*. n= 4 experimentos independientes. C) Densitometría del *Western blot* anterior. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas.

Dentro de la familia de genes de los HIFs existen otros miembros parálogos de HIF-1 α , como HIF-2 α . HIF-2 α , al igual que HIF-1 α , también presenta un dominio de degradación dependiente de oxígeno (Figura 35 A). De forma que en presencia de oxígeno es degradado, pero en su ausencia

puede interactuar con HIF-1 β y promover la expresión de genes como VEGF o EPO (Graham and Presnell, 2017). Por este motivo, se consideró la posibilidad de que, al igual que en el caso de HIF-1 α , la actividad sináptica también lo estabilizara. Sin embargo, tras estimular la actividad sináptica durante diferentes periodos de tiempo, no se observaron cambios en la estabilización de HIF-2 α (Figura 35 B, C).

8.3.2 HIF-1 α es necesario para activar el metabolismo de la glucosa en las neuronas estimuladas sinápticamente.

Para estudiar el papel de HIF-1 α en la activación del metabolismo neuronal se inhibió su actividad incubando los cultivos en presencia del fármaco echinomicina. La echinomicina es un péptido antibiótico con la capacidad de interactuar con la secuencia HRE y, en consecuencia, evitar la unión de HIF-1 α con el DNA (Kong *et al.*, 2005). Por este motivo es comúnmente utilizado como inhibidor de HIF-1 α . El tratamiento con echinomicina a una concentración final de 0.5 μ M redujo significativamente la cantidad de lactato liberado al medio de cultivo en neuronas estimuladas sinápticamente (Figura 36).

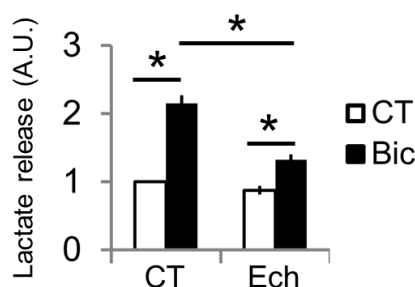


Figura 36: HIF-1 α es necesario para activar el metabolismo de la glucosa en las neuronas estimuladas sinápticamente. El lactato liberado al medio por las neuronas cultivadas en presencia o ausencia del inhibidor de HIF-1 α Echinomicina (Ech) a una concentración final de 0.5 μ M y estimuladas con Bic + 4-AP durante 24 horas. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey.

El análisis de la expresión génica de las enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa, estudiadas anteriormente, reveló que el tratamiento con echinomicina también bloquea la inducción en la transcripción de estos genes (Figura 37). En el caso de PKM no se observó tal efecto, aunque a las 24 horas de estimulación sí se observa cierta tendencia a la reducción de los niveles tras la estimulación. No obstante, se observó una elevada variabilidad en el efecto de la echinomicina en los diferentes genes. En el caso de Glut3 y PFKBP3 se observa una clara inhibición de la activación transcripcional tras 4 horas de estimulación y en el caso de PFKFB3

se observa también una reducción en los cultivos sin estimular. Esta variabilidad puede ser debida a efectos inespecíficos del fármaco.

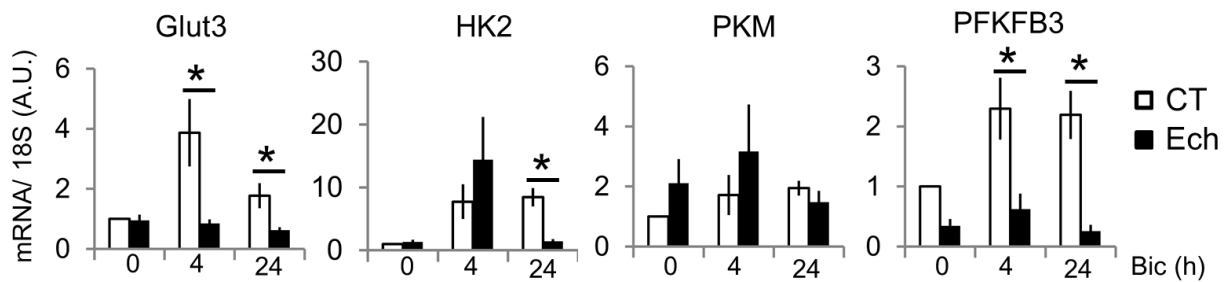


Figura 37: La inhibición de HIF-1 α mediante el tratamiento con echinomicina inhibe la estimulación por la actividad sináptica de la expresión de los genes implicados en el metabolismo de la glucosa. Los cultivos primarios de neuronas fueron incubados en presencia o ausencia del inhibidor de HIF-1 α Echinomicina (Ech) a una concentración final de 0.5 μ M y estimulados o no durante 4 y 24 horas. La expresión de los genes de interés se analizó mediante qPCR. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test post hoc de Tukey.

La echinomicina es un agente intercalante que interacciona con la secuencia HRE (Kong *et al.*, 2005). No obstante, como la mayoría de fármacos puede tener otras dianas no descritas. Podría interaccionar con otras secuencias de DNA no descritas. Por lo tanto, para confirmar que el efecto observado es debido a la inhibición de HIF-1 α y no a algún efecto inespecífico se desarrolló un dominante negativo de HIF-1 α (HIF-DN). Tal como se muestra en la Figura 38, para la construcción del dominante negativo se introdujo un codón STOP (UAG) en la secuencia de HIF-1 α humana, de forma que esta secuencia diese lugar a una forma truncada de HIF-1 α sin el dominio transactivador ni el dominio ODD. De forma que se expresa de forma constitutiva y es capaz de interaccionar con la subunidad β y con el DNA, pero es incapaz de activar la transcripción. La secuencia se clonó en un plásmido específico para la generación de AAVs.

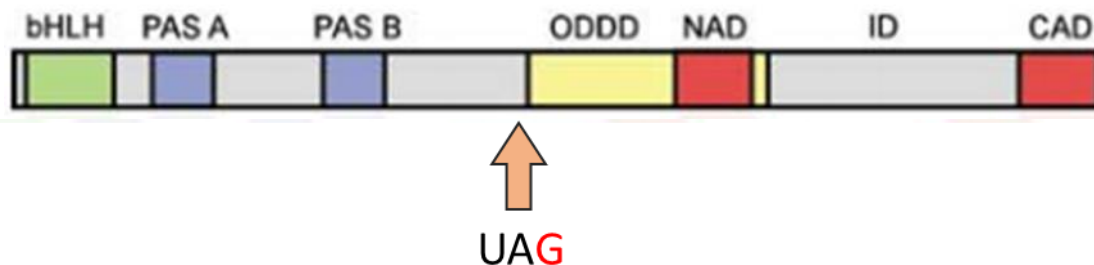


Figura 38: Esquema de la estructura de HIF-1 α con la modificación introducida para generar HIF-DN. Mediante PCR se introdujo una mutación en la G 1305 de la secuencia humana de HIF-1 α para generar un codón de STOP en este punto y se introdujeron dos dianas de restricción para clonar la secuencia resultante en un plásmido para su expresión en AAVs. Las diferentes siglas describen los dominios de HIF-1 α : bHLH (dominio básico hélice-bucle-hélice), PAS (dominio de homología Per-Arnt-Sim), NAD (dominio de transactivación N-terminal), ID (dominio inhibidor), CAD (dominio de transactivación C-terminal), ODDD (dominio de degradación dependiente de oxígeno). Imagen adaptada (Lisy and Peet, 2008).

La expresión de HIF-DN, mediante la infección con AVV, en neuronas estimuladas redujo tanto el incremento en la liberación de lactato como en la incorporación de glucosa en lípidos (Figura 39 A, B). A nivel transcripcional, HIF-DN bloqueó completamente la inducción de la actividad transcripcional por HIF-1 α en neuronas estimuladas sinápticamente (Figura 39 C). Como consecuencia, se observó una reducción en estimulación de la expresión de los genes del metabolismo de la glucosa previamente analizados con la excepción del transportador Glut3 (Figura 39 D). Teniendo en cuenta estos resultados es posible afirmar que la actividad sináptica estimula el metabolismo de la glucosa a nivel transcripcional mediante la activación de HIF-1 α .

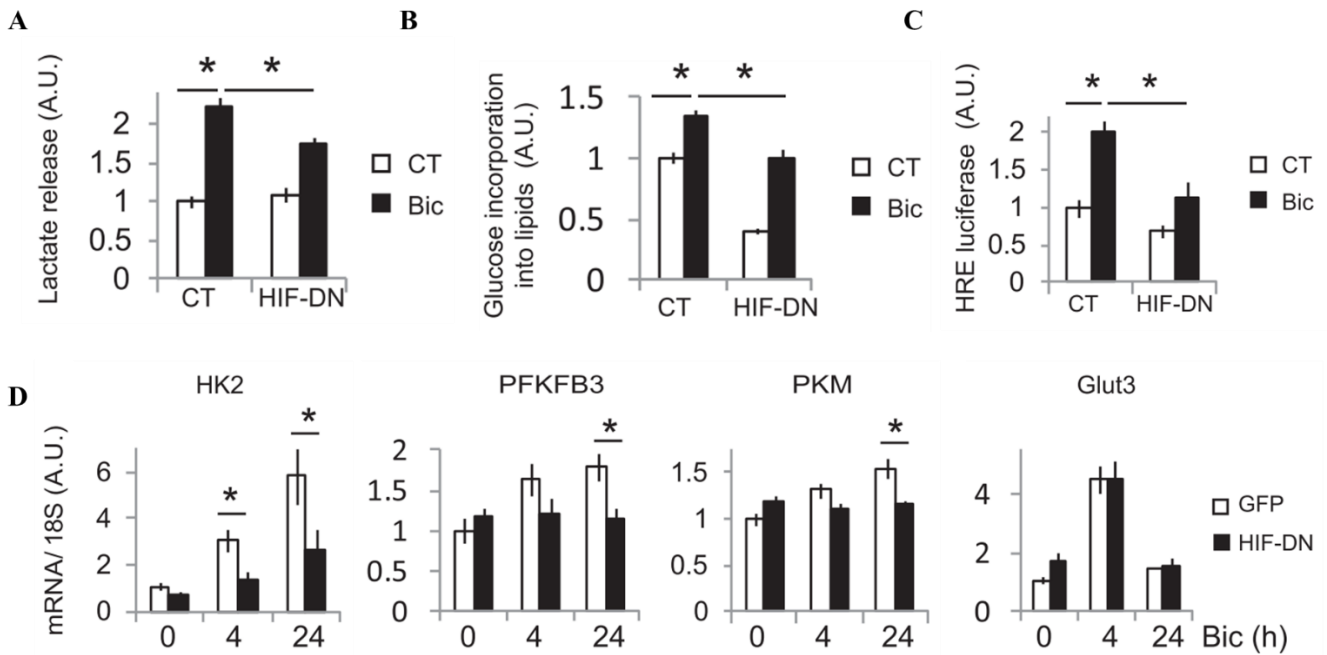


Figura 39: La actividad sináptica estimula el metabolismo de la glucosa a nivel transcripcional mediante la activación de HIF-1 α . A) El lactato liberado al medio por las neuronas transducidas con AAVs expresando HIF-DN o GFP (control) tras 24 horas de estimulación con Bic + 4-AP. n= 3 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * p <0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. B) Incorporación de 14 C-U-glucosa en lípidos en neuronas transducidas con AAVs expresando HIF-DN o GFP (control) tras 48 horas de estimulación con Bic + 4-AP. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * p <0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. C) Análisis mediante el gen reportero de luciferasa de la actividad transcripcional de HIF-1 α en neuronas transfectadas con un plásmido que codifica el dominante negativo HIF-DN o la proteína Globina (control) tras 8 horas de estimulación con Bic + 4-AP. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * p <0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. D) Los cultivos primarios de neuronas fueron transducidos con AAVs expresando HIF-DN o GFP (control) y estimulados o no durante 4 y 24 horas. La expresión de los genes de interés se analizó mediante qPCR. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * p <0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey.

8.3.3 La actividad sináptica estimula la transcripción de PDK1 y PDK3 mediante la activación de HIF-1 α .

El complejo enzimático PDH cataliza la síntesis de acetil-CoA, destinado al ciclo de Krebs, a partir del piruvato en la mitocondria (M. S. Patel *et al.*, 2014). Este complejo está formado por 3 subunidades diferentes: E1, E2 y E3. Siendo E1, también conocida como PDH la subunidad encargada de catalizar el paso limitante de la reacción llevada a cabo por el complejo PDH (M. S. Patel *et al.*, 2014). La actividad de esta enzima está regulada por las enzimas PDKs (Kolobova *et al.*, 2001). La fosforilación de la subunidad E1 por las diferentes isoformas de PDKs (1-4) inhibe su actividad, reduciendo el nivel de incorporación de piruvato al ciclo de Krebs e incrementando su conversión en lactato (Lunt and Vander Heiden, 2011). Se ha comprobado que la expresión de las isoformas PDK1 y PDK3 se incrementa bien en hipoxia, bien durante la reprogramación metabólica en células tumorales gracias a la activación del factor de transcripción HIF-1 α (Kim *et al.*, 2006; Papandreou *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2008; Kluza *et al.*, 2012; Chae *et al.*, 2016; Semba *et al.*, 2016).

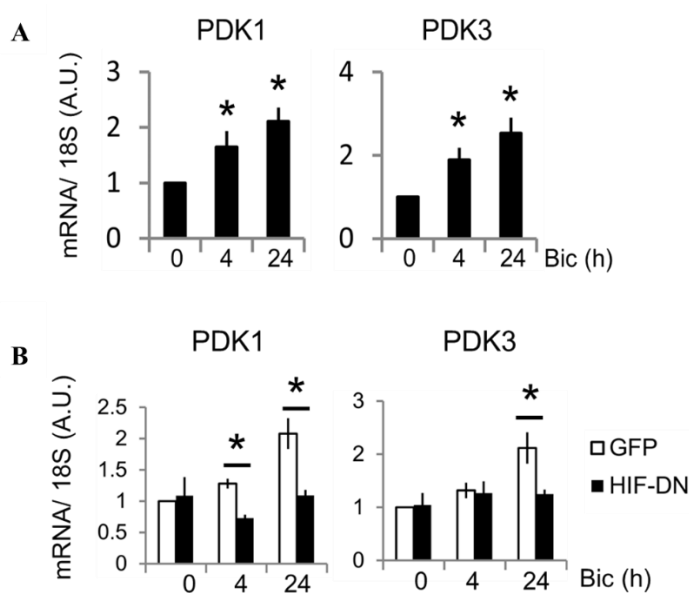


Figura 40: La actividad sináptica estimula la transcripción de PDK1 y PDK3 mediante la activación de HIF-1 α . A) Los cultivos de neuronas corticales fueron estimulados con Bic + 4-AP durante 4 y 24 horas. Los niveles de mRNA de PDK1 y PDK3 se determinaron por qPCR. n= 12-13 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. B) Los cultivos primarios de neuronas fueron transducidos con AAVs expresando HIF-DN o GFP (control) y estimulados o no durante 4 y 24 horas. La expresión de los genes de interés se analizó mediante qPCR. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test post hoc de Tukey.

Dado que la expresión de ambas enzimas es activada por el factor de transcripción HIF-1 α , se decidió comprobar si ambas enzimas podrían estar reguladas también por la actividad sináptica. Tal como puede comprobarse en la Figura 40 A, la actividad sináptica estimula la expresión tanto de PDK1 como de PDK3. Para comprobar si HIF-1 α estaba implicado en este proceso se analizó

de nuevo la expresión de estos genes, pero esta vez en cultivos infectados con un AAV que expresa el dominante negativo de HIF-1 α (HIF-DN). Tal como se esperaba, la expresión del dominante negativo bloqueó el incremento en la expresión de ambos genes debido a la estimulación sináptica (Figura 40 B).

8.4 LA ACTIVIDAD DE SIAH2 Y LDH ESTABILIZA HIF-1 α .

8.4.1 La actividad sináptica reduce la actividad de las enzimas PHDs.

La regulación de HIF-1 α es compleja. Existen diferentes mecanismos involucrados. Uno de los posibles mecanismos descritos es su regulación a nivel de mRNA, bien incrementando su síntesis, bien regulando su estabilidad (Wenger *et al.*, 1997; Pagé *et al.*, 2002; Chamboredon *et al.*, 2011) . No obstante, en cultivos neuronales estimulados durante 4 o 24 horas no se observó ningún cambio significativo en los niveles de mRNA de HIF-1 α (Figura 41 A).

Sin embargo, el mecanismo principal por el que HIF-1 α es regulado es su degradación en condiciones de normoxia. La hidroxilación de las prolinas 402 y 564, localizadas en el dominio ODD, por las PHDs promueve la ubiquitinización de HIF-1 α y su consecuente degradación por el proteasoma (Maxwell *et al.*, 1999; Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Por este motivo, se quiso comprobar si la actividad sináptica promovía la estabilización de HIF-1 α reduciendo la actividad de las PHDs. Con tal efecto, los cultivos neuronales fueron transfectados con un plásmido que contiene una construcción que consiste en la enzima luciferasa fusionada con el ODDD de HIF-1 α (ODD-Luc), de forma que, si las prolinas 402 y 564 presentes en el ODDD de esta construcción son hidroxiladas, esta proteína de fusión será ubiquitinizada y degradada por el proteasoma. La señal de las neuronas transfectadas con este plásmido se comparó con un control basado en la expresión de la enzima luciferasa salvaje bajo el control del promotor de CMV, el mismo que en el plásmido ODD-luc. Este control es especialmente importante dado que la actividad sináptica podría estimular la transcripción de los genes regulados por este promotor. Y por lo tanto sería imposible discernir si el incremento en la actividad luciferasa para las neuronas transfectadas con ODD-luc es debido a su estabilización o a un incremento en su transcripción. Tras un período de 8 horas de estimulación se observó un marcado incremento en la actividad luciferasa en el caso de las neuronas transfectadas con la construcción ODD-luc, pero no en el caso de las transfectadas con la luciferasa salvaje (Figura 41 B, C). Este resultado sugiere que la actividad sináptica reduce la actividad de las PHDs.

Otro posible mecanismo descrito es la regulación a nivel de mRNA, bien incrementando su síntesis, bien regulando su estabilidad (Wenger *et al.*, 1997; Pagé *et al.*, 2002; Chamboredon *et al.*, 2011). No obstante, en cultivos neuronales estimulados durante 4 o 24 horas no se observó ningún cambio significativo en los niveles de mRNA de HIF-1 α (Figura 41 C).

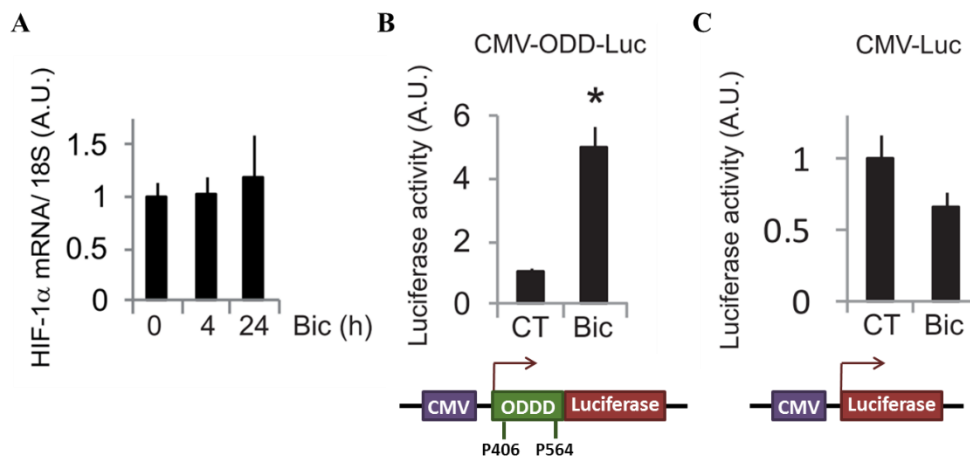


Figura 41: La actividad sináptica reduce la actividad de las enzimas PHDs. A) Las neuronas fueron estimuladas con Bic + 4-AP durante los periodos de tiempo indicados. Se analizaron los niveles de expresión de HIF-1 α por qPCR. n= 3 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. B) La actividad PHD tras la estimulación con Bic + 4-AP se analizó midiendo la actividad luciferasa en neuronas transfectadas con un plásmido que expresaba la enzima luciferasa fusionada con el dominio ODD de HIF-1 α . En el esquema inferior se resume la construcción empleada. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. C) Control de expresión del promotor CMV en neuronas estimuladas con Bic + 4-AP mediante la transfección de neuronas con un plásmido que expresa la luciferasa salvaje bajo el control del promotor CMV. En el esquema inferior se resume la construcción empleada. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas.

8.4.2 La actividad sináptica estimula la síntesis de Siah2 a nivel transcripcional:

Siah2 es una E3 ubiquitina ligasa que induce la estabilización de HIF-1 α principalmente mediante la degradación de las enzimas PHDs vía el proteasoma (Nakayama *et al.*, 2004). Sin embargo, también se han descrito otros mecanismos por los que puede promover la activación de HIF-1 α , como por ejemplo mediante la degradación de la quinasa similar a Polo 3 (Plk3, por sus siglas en inglés) (Li *et al.*, 2017). La estimulación de cultivos primarios de neuronas con Bic + 4-AP incrementó los niveles de Siah2 a nivel de mRNA (Figura 42 A). Tal como demuestran los análisis llevados a cabo por Sergi Casellas, este cambio también se observó a nivel de proteína (Figura 42 B-C). Como puede observarse en la Figura 42 B, el incremento en los niveles de proteína de Siah2 se correlaciona con el aumento en los de HIF-1 α . Tras media hora de estimulación ya se observó un incremento en sus niveles, precediendo a la estabilización de HIF-1 α que tienen lugar a partir de las 4h de estimulación.

De acuerdo con los resultados anteriores, el tratamiento con el factor de crecimiento BDNF también promovió la síntesis de Siah2 (Figura 42 D, E, F). Curiosamente, la respuesta a la

estimulación con BDNF suele retrasarse un poco con respecto a la respuesta a la actividad sináptica. Mientras es posible detectar un incremento en los niveles de HIF-1 α a partir de las dos horas de estimulación sináptica, tan solo se detectó este incremento tras las 4 horas de tratamiento con BDNF (Figura 34 A, B, E, F). En el caso de Siah2 ocurrió lo mismo, sus niveles de proteína se incrementaron tras media hora de estimulación sináptica y tras 2 horas de tratamiento con BDNF (Figura 42 B-E).

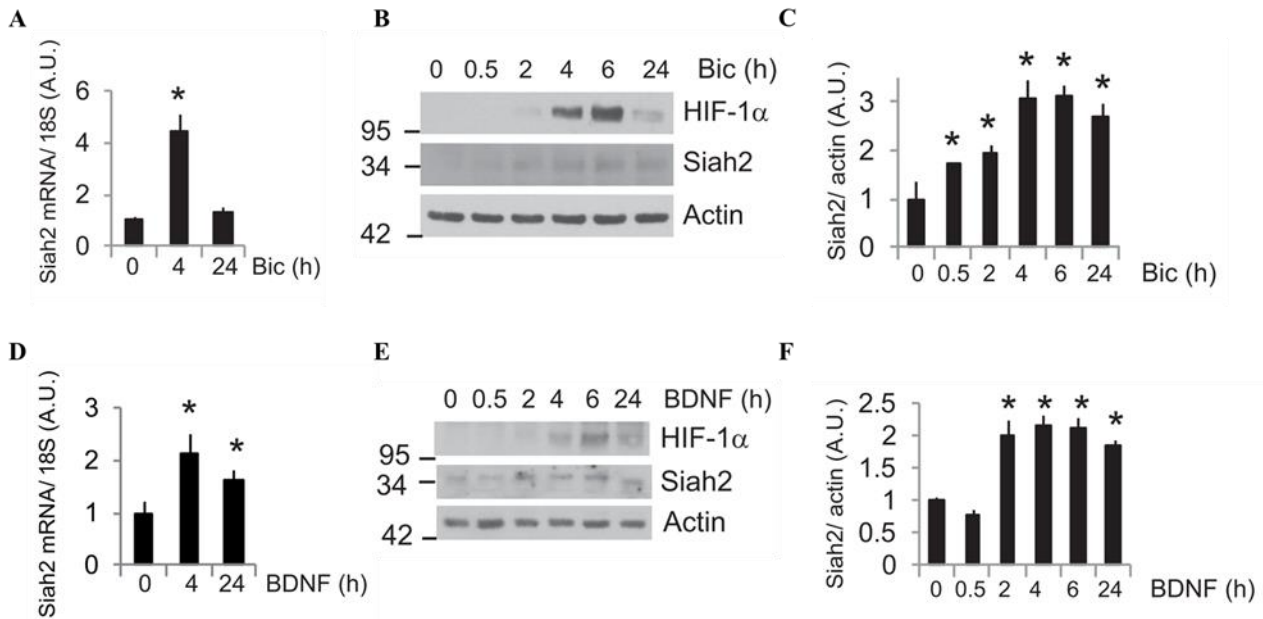


Figura 42: La actividad sináptica estimula la síntesis de Siah2 a nivel transcripcional. A) Los cultivos de neuronas corticales fueron estimulados con Bic + 4-AP durante 4 y 24 horas. Los niveles de mRNA de Siah2 se determinaron por qPCR. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. B) Los cultivos de neuronas corticales fueron estimulados con Bic + 4-AP durante los periodos de tiempo indicados. Los niveles de proteína de las proteínas indicadas fueron analizados por Western blot. = 3-5 experimentos independientes. C) Densitometría de las bandas de Siah2 del Western blot anterior. n= 3-5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. D) Los cultivos de neuronas corticales fueron tratados con BDNF (25 ng/ml) durante 4 y 24 horas. Los niveles de mRNA de Siah2 se determinaron por qPCR. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. E) Los cultivos de neuronas corticales fueron tratados con BDNF (25 ng/ml) durante los periodos de tiempo indicados. Los niveles de proteína de las proteínas indicadas fueron analizados por Western blot. = 4-5 experimentos independientes. F) Densitometría de las bandas de Siah2 del Western blot anterior. n= 4-5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas.

En mamíferos, la familia de proteínas Siah está compuesta por dos isoformas diferentes, Siah1 y Siah2. Ambas proteínas comparten una elevada similitud a nivel de secuencia (Figura 43 A). No es de extrañar, por lo tanto, que compartan algunos substratos (Krämer *et al.*, 2012). Sin embargo, a diferencia del caso de Siah2, se observó una reducción en la expresión de Siah1 tras estimular durante 4 horas los cultivos de neuronas corticales (Figura 43 B).

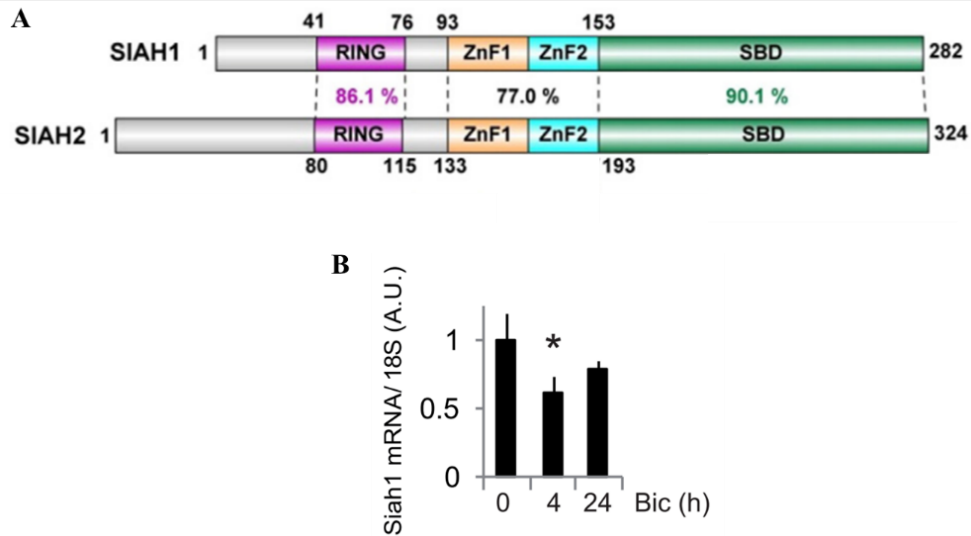


Figura 43: La actividad sináptica reduce la síntesis de Siah1 a nivel transcripcional. A) Esquema de la estructura de Siah1 y Siah2. Se indica el porcentaje de homología entre los diferentes dominios conservados de ambas isoformas. Imagen adaptada (Q. Zhang *et al.*, 2017). B) Los cultivos de neuronas corticales fueron estimulados con Bic + 4-AP durante 4 y 24 horas. Los niveles de mRNA de Siah1 se determinaron por qPCR. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas.

8.4.3 La actividad sináptica estabiliza HIF-1 α a partir de un mecanismo que depende de Siah2.

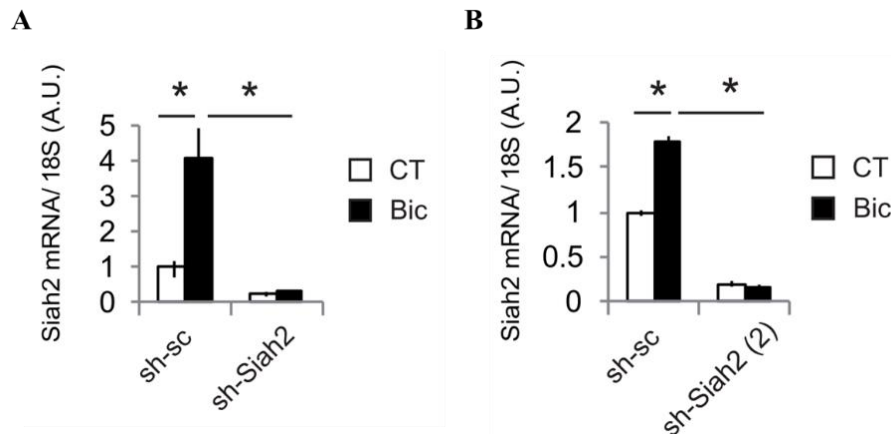


Figura 44: Ambos shRNAs dirigidos contra Siah2 inhiben satisfactoriamente la expresión de este gen. A) y B) Las neuronas fueron transducidas con AAVs expresando un shRNA control (sh-SC) o un shRNA contra Siah2 con dos secuencias diferentes (sh-Siah2 o sh-Siah2(2)) y estimuladas o no con Bic + 4-AP durante 4 horas. El nivel de expresión génica de Siah2 se analizó mediante qPCR. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey.

Con el objetivo de confirmar el papel de Siah2 en la estabilización de HIF-1 α por la actividad sináptica, se redujo la expresión de Siah2 mediante la transducción de las neuronas con dos

shRNAs diferentes contra Siah2. Para ello, se clonó las secuencias de ambos shRNAs en sendos plásmidos específicos para la generación de AAVs. Como se muestra en la Figura 44, ambos shRNAs redujeron satisfactoriamente la expresión de Siah2 tanto en neuronas en reposo como en neuronas estimuladas con Bic + 4-AP.

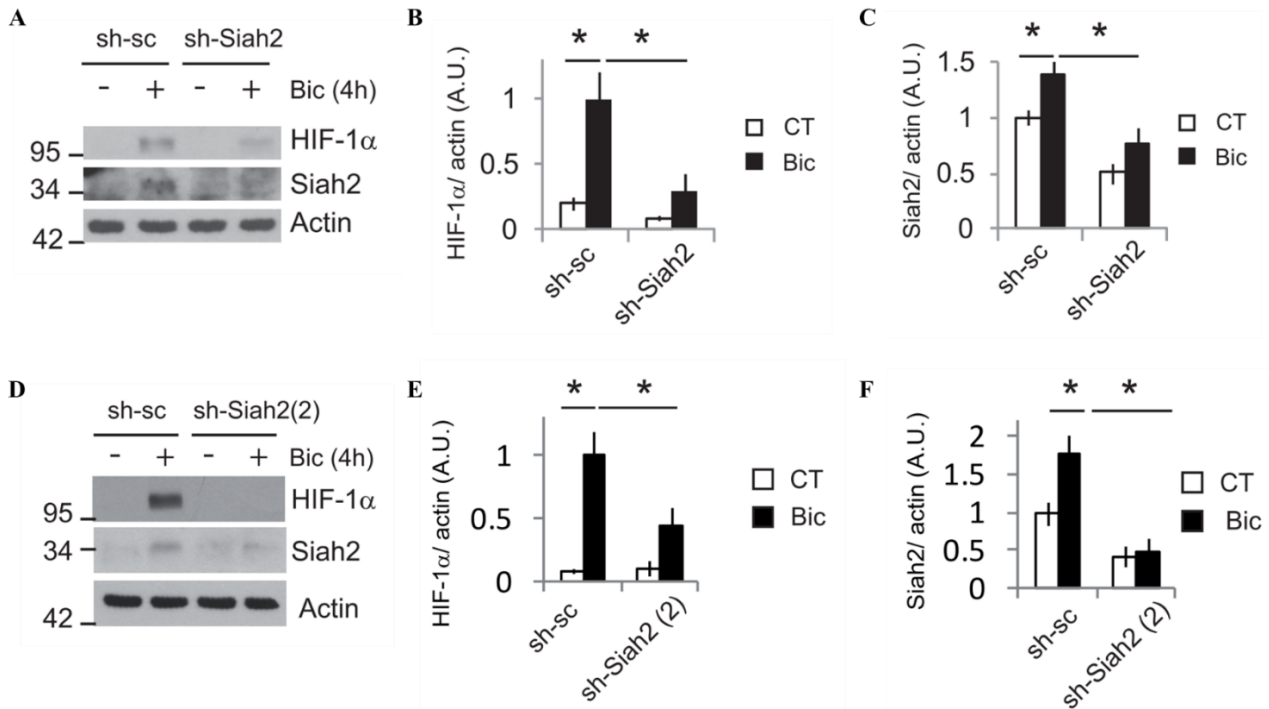


Figura 45: La actividad sináptica estabiliza HIF-1α a partir de un mecanismo que depende de Siah2. A) Las neuronas transducidas con un AAV-sh-SC (control) o sh-Siah2 fueron estimuladas con Bic + 4-AP durante 4 horas antes de analizar los niveles de las diferentes proteínas indicadas por *Western blot*. n = 5 experimentos independientes. B) Densitometría de las bandas de Siah2 del *Western blot* anterior. n = 5 experimentos independientes. Los valores representan la media ± e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. C) Densitometría de las bandas de HIF-1α del *Western blot* anterior. n = 5 experimentos independientes. Los valores representan la media ± e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. D) Las neuronas transducidas con un AAV-sh-SC (control) o sh-Siah2 (2) fueron estimuladas con Bic + 4-AP durante 4 horas antes de analizar los niveles de las diferentes proteínas indicadas por *Western blot*. n = 4 experimentos independientes. E) Densitometría de las bandas de Siah2 del *Western blot* anterior. n = 4 experimentos independientes. Los valores representan la media ± e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. F) Densitometría de las bandas de HIF-1α del *Western blot* anterior. n = 4 experimentos independientes. Los valores representan la media ± e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey.

El análisis por *Western blot* llevado a cabo por Sergi Casellas, en el *Knockdown* (KD) de Siah2 en cultivos primarios de neuronas corticales se observó una marcada reducción en el nivel de estabilización de HIF-1α tras la estimulación. Esta reducción coincidía con la esperada disminución en los niveles de Siah2 (Figura 45 A-C). Este efecto se observó con ambos shRNAs contra Siah2 (shSiah2) (Figura 45 D-F).

De acuerdo con estos resultados, la reducción en la expresión de Siah2 mediante la expresión de shSiah2 redujo tanto la cantidad de lactato liberada al medio tras la estimulación (Figura 46

A), como los niveles de glucosa incorporada en lípidos (Figura 46 B). Por lo tanto, se puede concluir que Siah2 estabiliza HIF-1 α tras la estimulación sináptica y por lo tanto es necesario para que esta active la glucólisis.

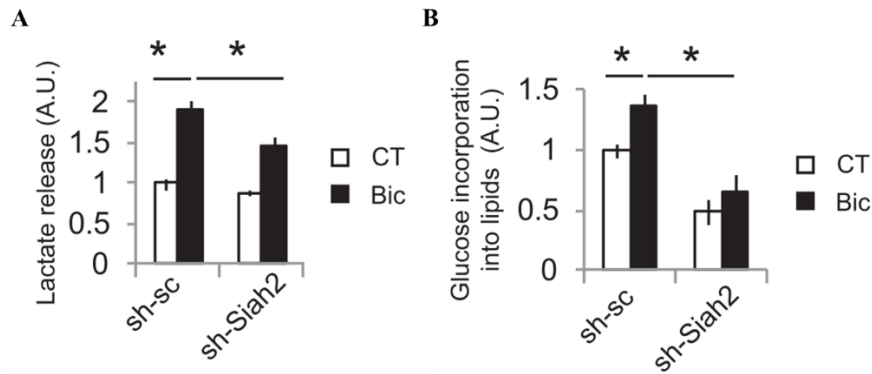


Figura 46: La activación del metabolismo por la actividad sináptica depende de la actividad de Siah2. A) El lactato liberado al medio por las neuronas transducidas con AAVs expresando sh-Siah2 o sh-sc tras 24 horas de estimulación con Bic + 4-AP. n= 3 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * p <0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. B) Incorporación de 14 C-U-glucosa en lípidos en neuronas transducidas con AAVs expresando sh-Siah2 o sh-sc tras 48 horas de estimulación con Bic + 4-AP. n= 7 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * p <0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey.

En línea con estos resultados, la reducción de los niveles de Siah2 también bloquea la inducción de la expresión de la enzima HK2 por la actividad sináptica (Figura 47 A, B). Esta observación parece confirmar la hipótesis de que Siah2 estabiliza HIF-1 α y finalmente este factor de transcripción estimula la transcripción de HK2.

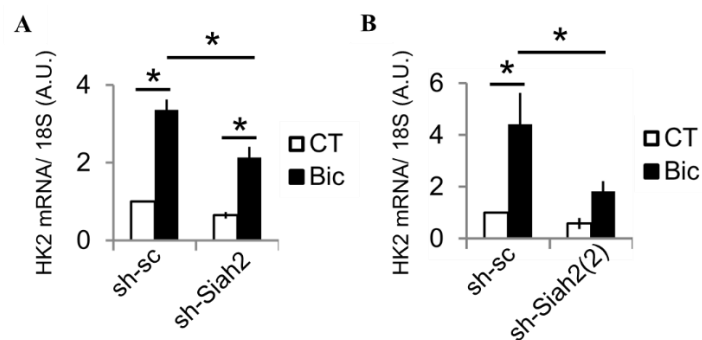


Figura 47: Siah2 juega un papel clave en la inducción de la expresión de HK2, uno de los genes implicados en la regulación del metabolismo de la glucosa, por la actividad sináptica. A) y B) Las neuronas fueron transducidas con AAVs expresando un shRNA control (sh-SC) o un shRNA contra Siah2 con dos secuencias diferentes (sh-Siah2 o sh-Siah2(2)) y estimuladas o no con Bic + 4-AP durante 24 horas. El nivel de expresión génica de HK2 se analizó mediante qPCR. n= 5-7 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * p <0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey.

8.5 CREB regula la expresión de Glut3 y Siah2.

8.5.1 La activación de la transcripción de Glut3 por la estimulación sináptica depende de CREB.

Dado que la expresión de Glut3 en las neuronas activas no depende de la activación de HIF-1 α (Figura 30 A), el siguiente paso fue analizar cuál podía el factor de transcripción implicado en su regulación. CREB es uno de los principales factores de transcripción encargados de la regulación de la expresión génica por la actividad sináptica (Greer and Greenberg, 2008; Bading, 2013), controla el crecimiento neurítico (Redmond, Kashani and Ghosh, 2002), y está implicado en la regulación del metabolismo en diferentes tipos celulares (Altarejos and Montminy, 2011). En estudios previos ya se ha mostrado que CREB puede regular la expresión de Glut3 (Rajakumar *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2013). Por lo tanto, se decidió comprobar si CREB podría estar implicado en la activación transcripcional de Glut3 por la actividad sináptica.

PKA es una de las principales proteínas quinasas implicadas en la activación de CREB como respuesta a un incremento en los niveles de cAMP (Sands and Palmer, 2008). Se ha comprobado que PKA es necesario para promover la traslocación de PKA en el núcleo y la consecuente activación de CREB como consecuencia de la entrada de Ca²⁺ en cultivos neuronales tras su despolarización (Impey *et al.*, 1998). La inhibición de la actividad de la PKA con el fármaco H89 (Murray, 2008) bloqueó la estimulación de la expresión de Glut3 por la actividad sináptica (Figura 48).

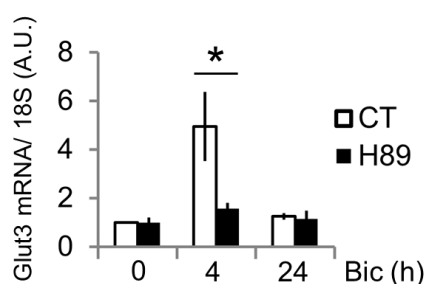


Figura 48: La activación de la transcripción de Glut3 por la estimulación sináptica depende de CREB. Las neuronas fueron estimuladas o no con Bic + 4-AP durante los periodos de tiempo indicados y cultivadas en presencia o no del inhibidor de PKA (5 μ M). El nivel de expresión génica de Glut3 se analizó por qPCR. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey.

Con el objetivo de confirmar que la activación de la expresión de Glut3 es debida a la activación de CREB y no a algún otro factor también inhibido por el fármaco H89 se inhibió la actividad de este factor de transcripción transduciendo los cultivos primarios de neuronas mediante un AAV que expresa un plásmido que codifica un dominante negativo de CREB (A-

CREB; Figura 49 A) (Ahn *et al.*, 1998). La inhibición de la actividad de CREB en neuronas estimuladas bloqueaba la inducción de Glut3 (Figura 49 B).

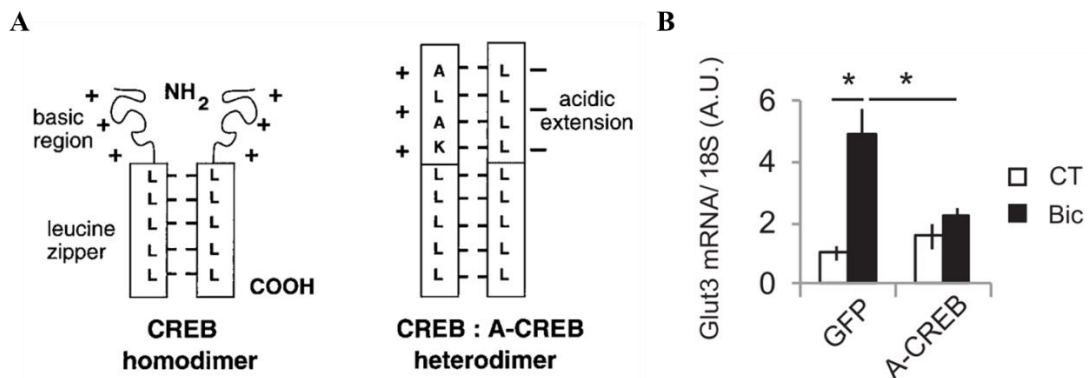


Figura 49: La activación de la transcripción de Glut3 por la estimulación sináptica depende de CREB. A) Esquemas que representan la estructura del homodímero de CREB y del heterodímero de CREB y su dominante negativo (A-CREB). Para generar A-CREB Ahn y colaboradores substituyeron el dominio básico de CREB, implicado en la interacción con el DNA, por un dominio ácido que interaccionaba preferentemente con el dominio básico de la proteína salvaje impidiendo su interacción con el DNA (Ahn *et al.*, 1998). B) Las neuronas fueron transducidas con AAVs expresando GFP (control) o el dominante negativo A-CREB y estimuladas o no con Bic + 4-AP durante 4 horas. El nivel de expresión génica de Glut3 se analizó mediante qPCR. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey.

8.5.2 La activación de la transcripción de Siah2 por la estimulación sináptica depende de CREB.

Dado que el patrón de expresión de Glut3 y Siah2 tras la estimulación sináptica es similar, un elevado aumento tras 4 horas de estimulación seguido por una marcada reducción a las 24 horas (Figura 30 A, Figura 42 A), se comprobó si CREB también estaba implicado en la activación transcripcional de Siah2. La expresión de A-CREB en neuronas estimuladas inhibió la activación de la transcripción de Siah2 por la actividad sináptica (Figura 50 A). Como muestran los análisis llevados a cabo por Sergi Casellas, este efecto también se observó a nivel de proteína. Como consecuencia también bloqueó satisfactoriamente la estabilización de HIF-1 α (Figura 50 B, D). Estos resultados indican, por lo tanto, que la activación del factor de transcripción CREB es necesaria para la estabilización de HIF-1 α promovida por la actividad sináptica.

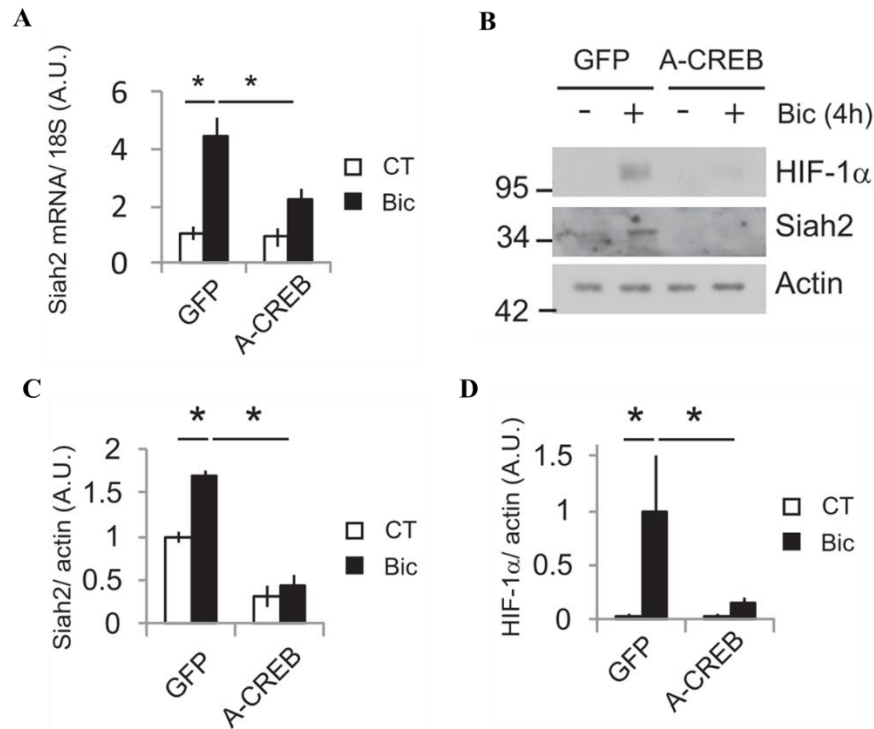


Figura 50: La activación de la transcripción de Siah2 por la estimulación sináptica depende de CREB. A) Las neuronas fueron transducidas con AAVs expresando GFP (control) o el dominante negativo A-CREB y estimuladas o no con Bic + 4-AP durante 4 horas. El nivel de expresión génica de Siah2 se analizó mediante qPCR. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test post hoc de Tukey. B) Las neuronas transducidas con AAVs expresando GFP (control) o el dominante negativo A-CREB fueron estimuladas con Bic + 4-AP durante 4 horas antes de analizar los niveles de las diferentes proteínas indicadas por Western blot. n = 3 experimentos independientes. C) Densitometría de las bandas de Siah2 del Western blot anterior. n= 3 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test post hoc de Tukey. D) Densitometría de las bandas de HIF-1 α del Western blot anterior. n= 3 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test post hoc de Tukey.

Teniendo en cuenta los resultados previamente presentados, se decidió analizar la actividad transcripcional de ambos factores de transcripción, CREB y HIF-1 α , tras diferentes periodos de tiempo tras el inicio de la estimulación sináptica y comprobar si existía alguna diferencia. Para ello se utilizaron dos construcciones diferentes formadas por el gen reportero de luciferasa bajo el control de la secuencia de unión con el DNA de CREB, CRE, o de HIF-1 α , HRE. Al comparar ambos gráficos se observó que, mientras tan solo dos horas tras la estimulación sináptica ya se observa un incremento significativo en la actividad transcripcional de CREB, hasta pasadas cuatro horas no se observa cambio alguno en la actividad de HIF-1 α (Figura 51 A, B). El hecho de que la activación de CREB preceda a la activación de HIF-1 α en dos horas ayuda a confirmar la idea de que la actividad sináptica activa CREB en primer lugar, y a continuación este promueve la expresión de Siah2 que finalmente estabiliza HIF-1 α .

De acuerdo con los resultados previos, la sobreexpresión del inhibidor endógeno de CREB, ICER (Molina *et al.*, 1993), también bloqueó el incremento en la actividad a nivel transcripcional de HIF-1 α promovido por la actividad sináptica (Figura 51 C). Sin embargo, la expresión de ICER no afectó a la actividad de MEF2 (Figura 51 D), otro factor de transcripción regulado por la actividad sináptica (Greer and Greenberg, 2008), tal como muestra el análisis mediante el gen reportero de la luciferasa precedido por la secuencia de unión de este factor de transcripción (elemento de respuesta a MEF2; MRE). Este resultado confirma que la actividad inhibitoria de ICER es específica de CREB y no afecta otras vías reguladas por la actividad sináptica.

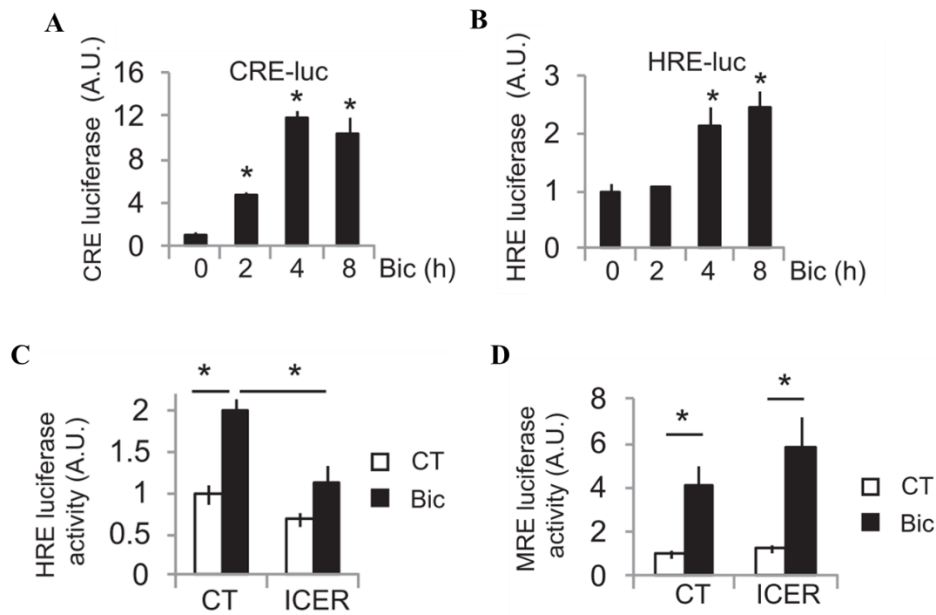


Figura 51: La estabilización y activación de HIF-1 α por la estimulación sináptica depende de CREB. A) Análisis mediante el gen reportero de luciferasa de la actividad transcripcional de CREB a los periodos de tiempo indicados tras la estimulación de los cultivos neuronales con Bic + 4-AP. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. B) Análisis mediante el gen reportero de luciferasa de la actividad transcripcional de HIF-1 α a los periodos de tiempo indicados tras la estimulación de los cultivos neuronales con Bic + 4-AP. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. C) Análisis mediante el gen reportero de luciferasa de la actividad transcripcional de HIF-1 α en neuronas transfectadas con un plásmido que codifica el inhibidor endógeno de CREB ICER o la proteína Globina (control) tras 8 horas de estimulación con Bic + 4-AP. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. D) Análisis mediante el gen reportero de luciferasa de la actividad transcripcional de MEF2 en neuronas transfectadas con un plásmido que codifica el inhibidor endógeno de CREB ICER o la proteína Globina (control) tras 8 horas de estimulación con Bic + 4-AP. n= 7 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey.

La forskolina es un activador de la enzima adenilato ciclasa y por lo tanto un activador de CREB (Müller *et al.*, 2001). El tratamiento con este fármaco fue suficiente para activar la expresión de Siah2 y como consecuencia la estabilización y activación de HIF-1 α (Figura 52 A-D). De acuerdo con estos resultados, el tratamiento con FSK durante 4 horas estimula la expresión de los genes implicados en el metabolismo de la glucosa estudiados anteriormente (Figura 52 E).

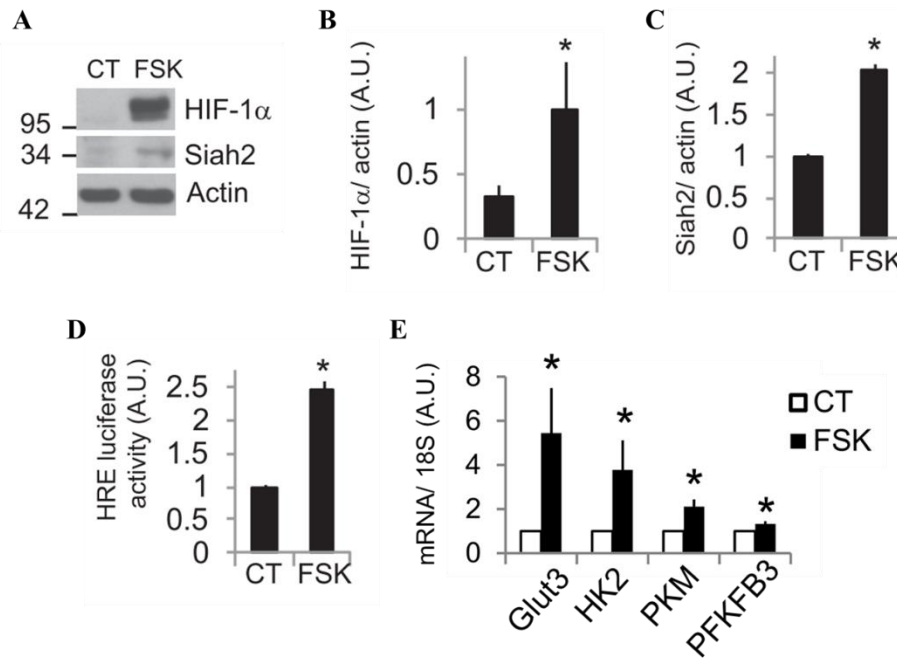


Figura 52: La activación farmacológica de CREB mediante el fármaco forskolina (FSK) es suficiente para incrementar los niveles de HIF-1 α y Siah2 y estimular el metabolismo de la glucosa, pero no para activar su incorporación en lípidos. A) Los cultivos primarios de neuronas fueron incubados en presencia de FSK 10 μ M durante 4 horas antes de analizar los niveles de las diferentes proteínas indicadas por *Western blot*. n = 4 experimentos independientes. B) Densitometría de las bandas de HIF-1 α del *Western blot* anterior. n = 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. C) Densitometría de las bandas de Siah2 del *Western blot* anterior. n = 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. D) Análisis mediante el gen reportero de luciferasa de la actividad transcripcional de HIF-1 α tras la incubación de los cultivos neuronales en presencia de FSK 10 μ M durante 8 horas. n = 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. E) Los cultivos primarios de neuronas fueron incubados en presencia de FSK 10 μ M durante 4 horas antes de analizar los niveles de mRNA de los genes del metabolismo de la glucosa por qPCR. n = 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas.

En línea con estos resultados, se observó que la inhibición de CREB mediante la expresión de A-CREB en cultivos primarios de neuronas estimulados con Bic + 4-AP bloqueó el incremento en la liberación de lactato al medio (Figura 53 A), mientras que la activación farmacológica de CREB con FSK incrementaba los niveles de lactato extracelular (Figura 53 B).

Por otro lado, se comprobó que a pesar de que la expresión del dominante negativo de CREB era capaz de bloquear el incremento observado en la incorporación de glucosa en lípidos en neuronas sinápticamente estimuladas (Figura 53 C), el tratamiento con FSK no tuvo efecto alguno en la incorporación de glucosa en lípidos (Figura 53 D), de acuerdo con lo visto en estudios previos donde se demostró que el incremento en los niveles de cAMP potenciaba el crecimiento neurítico en respuesta a diferentes factores neurotróficos, pero no estimulaba el crecimiento por se (Goldberg *et al.*, 2002).

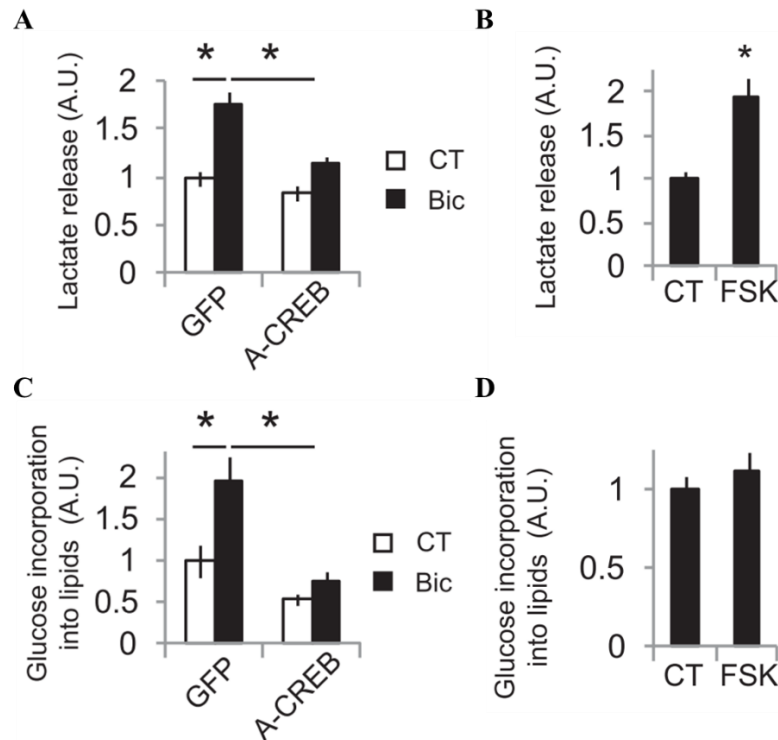


Figura 53: La estimulación del metabolismo de la glucosa y de la síntesis de lípidos a partir de esta última por la actividad sináptica depende de la actividad de CREB. A) Lactato liberado al medio por las neuronas transducidas con AAVs expresando el dominante negativo ACREB o GFP (control) tras 24 horas de estimulación con Bic + 4-AP. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. B) Lactato liberado al medio por neuronas incubadas en presencia de FSK 10 μ M durante 24 horas. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. C) Incorporación de ¹⁴C-U-glucosa en lípidos en neuronas transducidas con AAVs expresando el dominante negativo ACREB o GFP (control) tras 48 horas de estimulación con Bic + 4-AP. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. D) Incorporación de ¹⁴C-U-glucosa en lípidos en neuronas incubadas en presencia de FSK 10 μ M durante 48 horas. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas.

Los resultados presentados hasta ahora indican que la actividad sináptica promueve la actividad del factor de transcripción CREB, que promueve la expresión de Siah2. Como consecuencia se estabiliza HIF-1 α y activa la expresión de los genes implicados en el metabolismo glucolítico (HK2, PKM, PFKFB3) que, junto con Glut3, promueven el transporte y el metabolismo de la glucosa, necesaria para el crecimiento axonal.

8.6 La glucólisis es necesaria para el correcto desarrollo del crecimiento neurítico.

8.6.1 HIF-1 α y Siah2 juegan un papel clave en la estimulación del crecimiento neurítico.

Tanto Siah2 como HIF-1 α juegan un papel clave en la activación de la glucólisis por la actividad sináptica. Dado que la estimulación de esta vía metabólica es necesaria para sintetizar los lípidos utilizados en la generación de las nuevas membradas destinadas al crecimiento de dendritas y axones (Figura 21, Figura 46), se decidió estudiar el papel de Siah2 y HIF-1 α en el crecimiento de neuronas en cultivo. Tanto la sobreexpresión de HIF-1 α como la de Siah2 en neuronas corticales inmaduras, a DIV3, incrementó la longitud neurítica (Figura 54 A-C), que en este estado se corresponde con el crecimiento axonal dado que en este estadio todavía no se ha establecido la morfología neuronal final (Dotti, Sullivan and Banker, 1988).

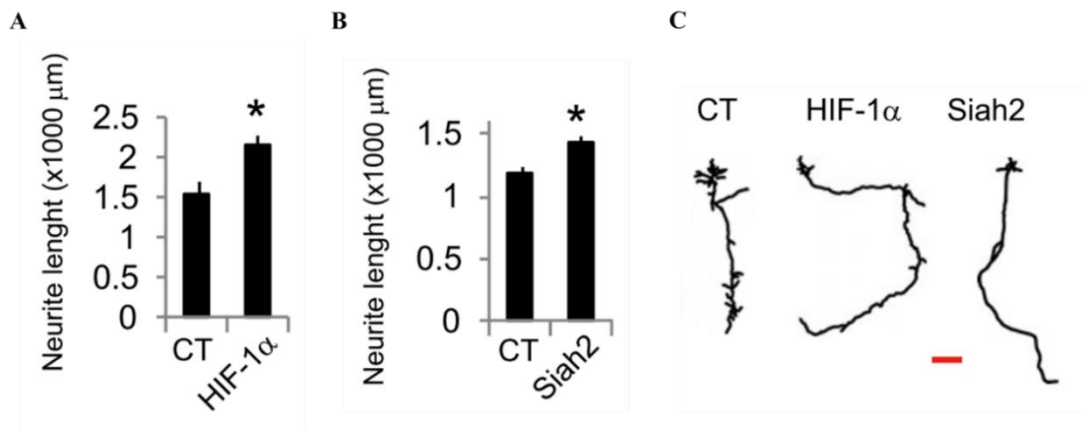


Figura 54: HIF-1 α y Siah2 estimulan el crecimiento neurítico en neuronas inmaduras. A) Análisis de la longitud neurítica total de neuronas inmaduras transfectadas a DIV1 con un plásmido que codifica la GFP y otro plásmido que codifica HIF-1 α o la proteína Globina (control) y fijadas 48 horas tras la transfección. n=27-40 neuronas de seis experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. B) Análisis de la longitud neurítica total de neuronas inmaduras transfectadas a DIV1 con un plásmido que codifica la GFP y otro plásmido que codifica Siah2 o la proteína Globina (control) y fijadas 48 horas tras la transfección. n=27-40 neuronas de seis experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. C) Trazos representativos del análisis de la longitud neurítica mostrados anteriormente. Barra de escala: 100 μ m.

En neuronas maduras, a DIV10, la expresión de HIF-DN o de un pool de 4 siRNA contra Siah2 (Dharmacon) bloqueó la estimulación del crecimiento neurítico inducida por la actividad sináptica. (Figura 55 A, B, Figura 56 A, B). Estos resultados demuestran que la actividad sináptica estimula el crecimiento neurítico mediante un mecanismo que depende tanto de Siah2 como de HIF-1 α . Por lo tanto, teniendo en cuenta tanto los resultados con neuronas maduras como

inmaduras es posible afirmar que ambas proteínas son importantes mediadores en la activación del crecimiento neurítico en cultivos neuronales.

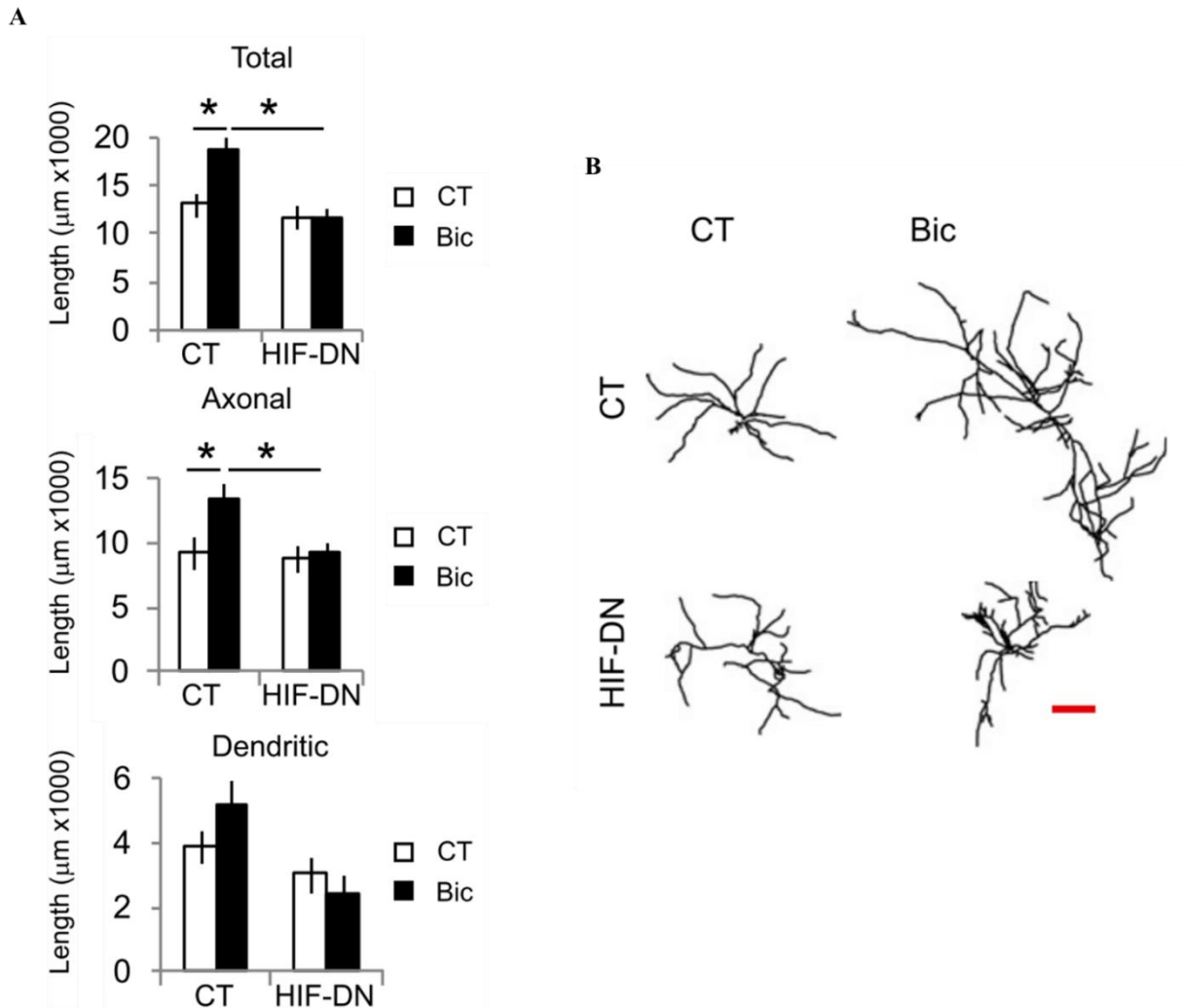


Figura 55: HIF-1 α es necesario para la estimulación del crecimiento axonal por la actividad sináptica. A) Longitud neurítica total, de axones y de dendritas del árbol neurítico de neuronas control o estimuladas con Bic + 4-AP durante un periodo de 48h tras ser transfectadas con plásmidos de GFP y de la proteína Globina (control) o HIF-DN. n=27-36 neuronas de seis experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. B) Trazos representativos del análisis de la longitud neurítica mostrado anteriormente. Barra de escala: 500 μ m.

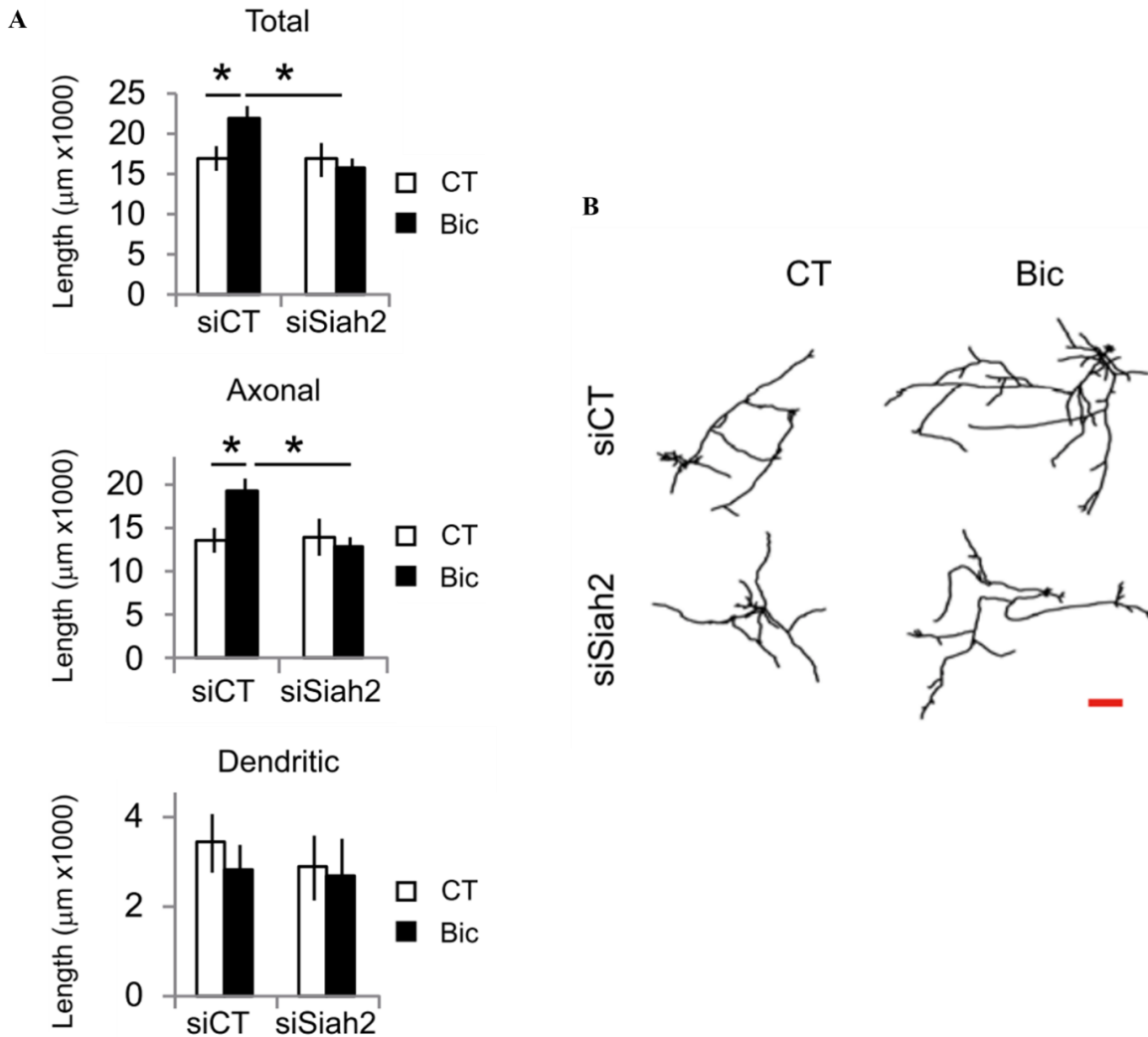


Figura 56: Siah2 es necesario para la estimulación del crecimiento axonal por la actividad sináptica. A) Longitud neurítica total, de axones y de dendritas del árbol neurítico de neuronas control o estimuladas con Bic + 4-AP durante un periodo de 48h tras ser transfectadas con un pool de 4 siRNAs control (siCT) o un pool de 4 siRNAs contra Siah2 (siSiah2). n=27-36 neuronas de seis experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. B) Trazos representativos del análisis de la longitud neurítica mostrado anteriormente. Barra de escala: 500 μ m.

8.6.2 La glucólisis es necesaria para el correcto crecimiento del árbol dendrítico durante el desarrollo postnatal.

El período durante el desarrollo de los roedores de mayor crecimiento neurítico se corresponde con las tres primeras semanas tras el nacimiento, siendo la actividad sináptica uno de los principales efectores de este crecimiento (Wong and Ghosh, 2002). Con el objetivo de conocer el papel de la glucosa en el desarrollo neuronal *in vivo*, se le administró el inhibidor de la PFKFB3 3-PO (Schoors *et al.*, 2014) durante cinco días a crías de rata en estadio P8. El análisis de la morfología neuronal mediante la tinción de Golgi mostró que los árboles neuríticos de las

neuronas piramidales de la capa V de la corteza somatosensorial de cerebros de las ratas a las que se les había administrado el fármaco tenían una menor complejidad (Figura 57 A, B).

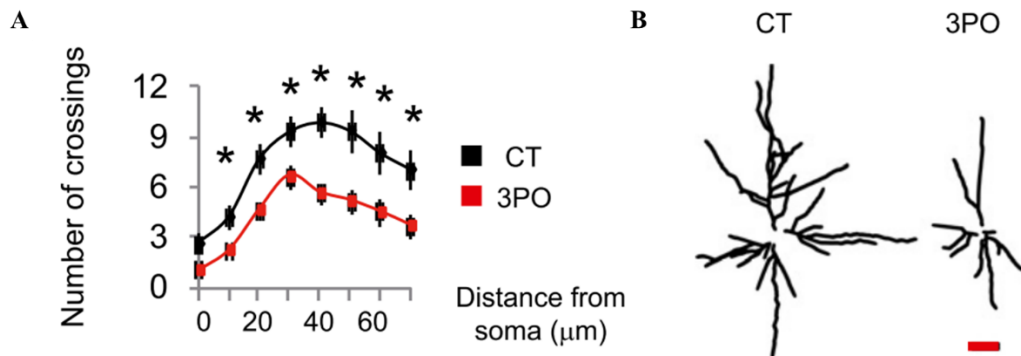


Figura 57: La glucólisis necesaria para el correcto crecimiento del árbol dendrítico durante el desarrollo post-natal. A) Análisis de Sholl de neuronas piramidales de la capa V de la corteza somatosensorial de cerebros de ratas P14 tras administrarles DMSO o el inhibidor de la PFKFB3 3PO (50 mg/kg) durante 5 días consecutivos. La visualización de las neuronas es posible gracias a la realización de la tinción de Golgi. n=15-20 neuronas de cuatro ratas por condición. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. B) Trazos representativos del análisis anterior. Barra de escala: 100 μ m.

8.6.3 HIF-1 α juega un papel clave en el crecimiento del árbol dendrítico durante el desarrollo postnatal.

Se ha demostrado que HIF-1 α juega un papel clave en el desarrollo neuronal *in vivo*, ya que la delección de HIF-1 α en las células progenitoras neuronales causa el atrofiamiento de la corteza cerebral (Tomita *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta estos resultados y los presentados anteriormente en este estudio se decidió estudiar su papel en crecimiento neurítico en ratones.

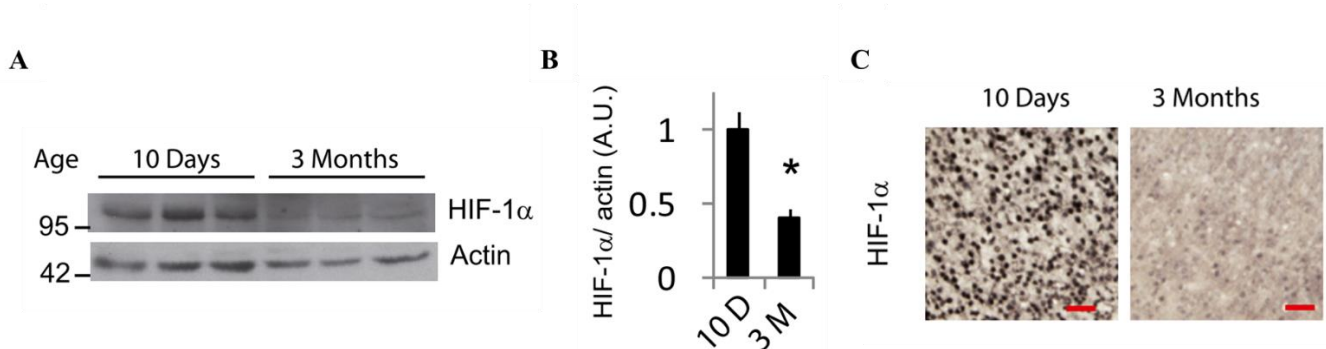


Figura 58: Los niveles de HIF-1 α en la corteza cerebral son elevados durante el desarrollo post-natal. A) Análisis mediante *Western blot* de los niveles de HIF-1 α en los extractos de proteína de cortezas cerebrales de ratones de 10 días o 3 meses de edad. n=4 ratones por condición B) Densitometría de las bandas de HIF-1 α del *Western blot* anterior. n=4 ratones por condición. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. C) Detección por inmunohistoquímica de HIF-1 α en secciones coronales de cerebros de ratones de ratones de 10 días o 3 meses de edad. En las imágenes se muestra la capa V de la corteza somatosensorial. n=3 ratones por condición. Barra de escala: 50 μ m.

En primer lugar, se compararon sus niveles en las cortezas cerebrales entre ratones postnatales de 10 días y ratones adultos de 3 meses. El análisis de los niveles de HIF-1 α llevados a cabo por Sergi Casellas en extractos de proteína de cortezas cerebrales mediante *Western blot* mostró unos mayores niveles de HIF-1 α en las cortezas de los ratones P10 que en la de los ratones adultos (Figura 58 A-B). Este resultado se confirmó tras el marcaje mediante inmunohistoquímica de HIF-1 α . En las neuronas de la capa V de la corteza de los ratones postnatales se observó un marcaje mucho más intenso que en las de los adultos (Figura 58 C). El marcaje observado es principalmente nuclear, ya que HIF-1 α tras su estabilización es rápidamente transportada al núcleo celular.

A partir de este punto se centró el estudio en la expresión de HIF-1 α en ratones postnatales. En los análisis por inmunohistofluorescencia llevados a cabo por Marina Ramiro en ratones P10 se observa una elevada expresión de HIF-1 α en la corteza, el hipocampo y en el cuerpo calloso (Figura 59 A). Tal como se ha comentado previamente existe una elevada controversia con respecto al metabolismo neuronal. Para corroborar si *in vivo* la expresión de HIF-1 α tiene lugar específicamente en neuronas se llevó a cabo un análisis mediante inmunofluorescencia de la co-localización de HIF-1 α y NeuN, un marcador específico de neuronas, o GFAP, un marcador específico de astrocitos. El doble marcaje demostró que en la corteza de ratones P10 HIF-1 α co-localiza con el primer marcador pero no con el segundo (Figura 59 B). Por lo tanto, es posible concluir que durante el desarrollo postnatal en la corteza cerebral HIF-1 α se expresa en neuronas, pero no en astrocitos.

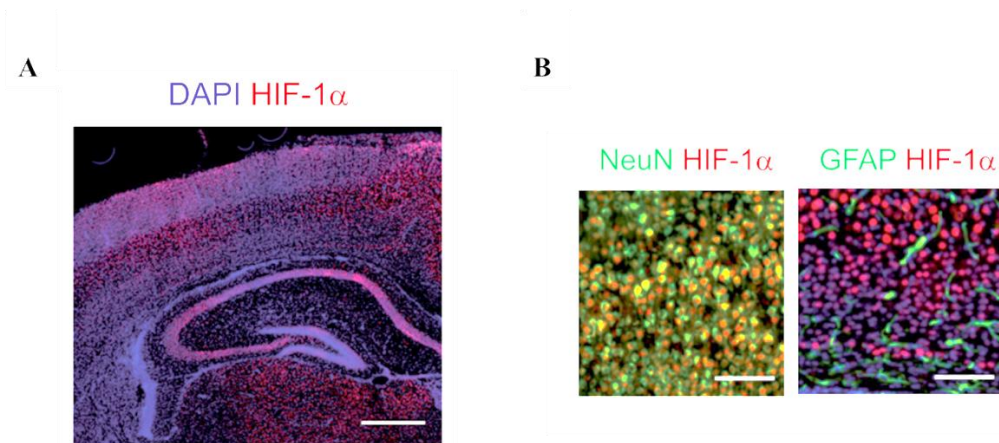


Figura 59: En el cerebro postnatal HIF-1 α se expresa las neuronas de la corteza, el hipocampo y el cuerpo calloso. A) Análisis por inmunohistofluorescencia para determinar los niveles de HIF-1 α en secciones coronales de cerebros de ratones P10. n= 3 ratones. Barra de escala: 100 μ m. B) Análisis por inmunohistofluorescencia para determinar la co-localización de HIF-1 α y de los marcadores específicos de neuronas, NeuN, y de astrocitos, MGARP, en secciones coronales de cerebros de ratones P10. n= 3 ratones. Barra de escala: 200 μ m.

Con el objetivo de estudiar mejor el papel de HIF-1 α durante el desarrollo neurítico *in vivo*, se estudiaron las diferencias en la complejidad del árbol neurítico en ratones de entre 4 y 6 meses cuyo gen de HIF-1 α había sido delecionado de forma específica entre los 3 y 5 días de vida. Para ello se utilizaron ratones KO condicionales para HIF-1 α generados en el laboratorio del Dr. Julián Aragonés de la Universidad Autónoma de Madrid. El tamoxifeno les fue administrado a través de la leche materna para evitar la manipulación directa de las crías y evitar el rechazo materno. Para ello, el tamoxifeno fue administrado directamente a la madre durante el periodo de lactancia por inyección intraperitoneal. Cuando los ratones alcanzaron la edad adulta fueron enviados a la UEA de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona donde fueron estabulados hasta su sacrificio. Tras su recepción, los ratones se genotiparon y para asegurarse de que el KO había funcionado se analizaron los niveles de expresión de HIF-1 α en un ratón WT y otro KO. Tal como se muestra en la Figura 60, se observa una clara reducción en los niveles de expresión de HIF-1 α en el ratón KO.

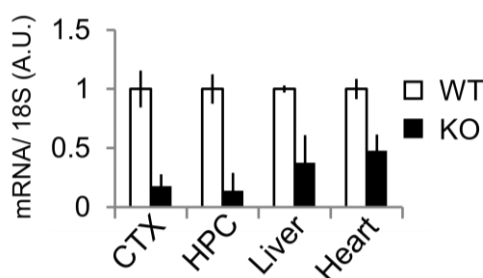


Figura 60: Los ratones HIF-1 α KO tienen reducidos los niveles de expresión de esta proteína en diferentes tejidos. Tras sacrificar los ratones adultos, uno WT y otro con el gen HIF-1 α delecionado durante los primeros estadios del desarrollo postnatal (KO), se extrajeron y diseccionaron los tejidos indicados y se aisló su mRNA. Los niveles de expresión de HIF-1 α se analizaron por qPCR. n= un ratón por condición. Los valores representan la media \pm e.e.m (valores réplicas técnicas).

Como en el experimento presentado en la Figura 57, la arquitectura neuronal se estudió mediante la tinción de Golgi y el análisis de Sholl. Tal como se puede observar en la Figura 61 A, B los ratones KO presentaban una menor complejidad neurítica. Curiosamente, *in vitro* el metabolismo de la glucosa es necesario para promover el crecimiento axonal, a pesar de que no tiene ningún efecto en el crecimiento dendrítico, mientras que *in vivo* se observa un efecto a nivel dendrítico. Debido al hecho de que para llevar a cabo este análisis es necesario cortar el tejido en secciones de 150 μ m es complicado llevar a cabo la medida de la longitud axonal. La mayoría de axones quedan cortados y distribuidos a lo largo de diferentes secciones. Estos resultados parecen demostrar que la inducción del metabolismo de la glucosa en neuronas es necesaria para permitir el desarrollo neuronal apropiado.

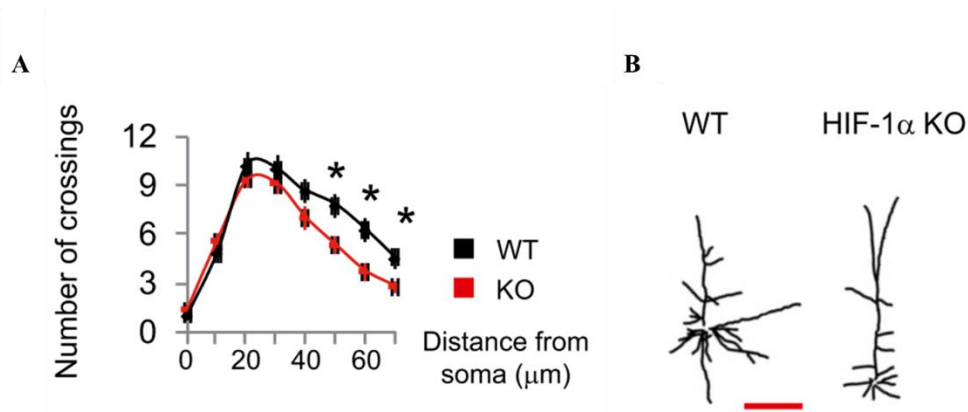


Figura 61: HIF-1 α juega un papel clave en el crecimiento del árbol dendrítico durante el desarrollo postnatal. A) Análisis de Sholl de neuronas piramidales de la capa V de la corteza somatosensorial de cerebros de ratones adultos WT o con el gen HIF-1 α deleciónado durante los primeros estadios del desarrollo postnatal (KO). La visualización de las neuronas es posible gracias a la realización de la tinción de Golgi. n=16 neuronas de tres ratones por condición. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, prueba t de Student de dos colas. B) Trazos representativos del análisis anterior. Barra de escala: 100 μ m.

8.7 Regulación del factor de crecimiento igf1 por la actividad sináptica.

El factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1, por sus siglas en inglés) es un polipéptido estructuralmente similar a la insulina. Aunque su síntesis tiene lugar principalmente en el hígado puede ser sintetizado localmente en diferentes órganos como el cerebro. Tras interactuar con su receptor (IGFR) activa tanto la vía de las MAP quinasas como la vía de la PI3K (Wrigley, Arafa and Tropea, 2017). En neuronas, IGF1 es capaz de incrementar el crecimiento neurítico así como regular su migración.(Xiang *et al.*, 2011). Se ha comprobado que IGF1 juega un papel clave en la regulación de la actividad sináptica. El bloqueo de su actividad es capaz de reducir la transmisión del impulso nervioso inhibiendo el flujo del Ca²⁺ presináptico (Gazit *et al.*, 2016). La señalización inducida por este factor de crecimiento estimula la activación del factor de transcripción CREB (Zheng and Quirion, 2006; Zuloaga *et al.*, 2013). Por otro lado, IGF1 es capaz de incrementar la captación de glucosa activando la traslocación de Glut4 (Cheng *et al.*, 2000).

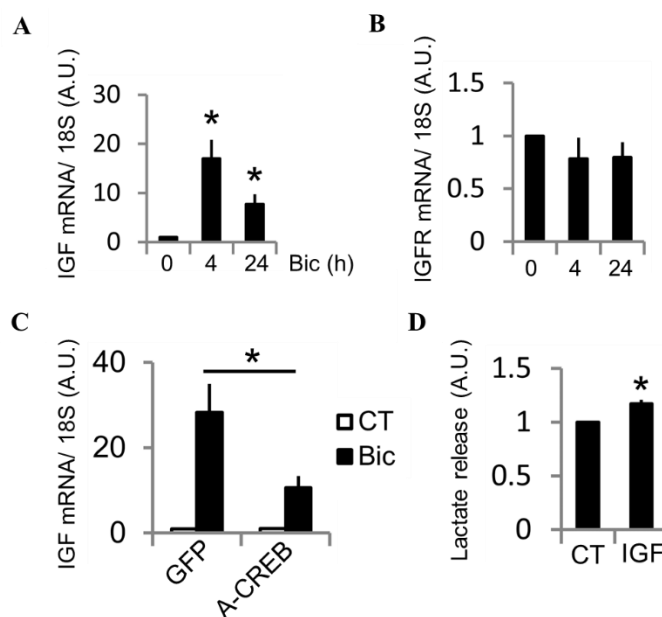


Figura 62: CREB regula la expresión del factor de crecimiento IGF por la actividad sináptica. A) Los cultivos de neuronas corticales fueron estimulados con Bic + 4-AP durante 4 y 24 horas. Los niveles de mRNA de IGF se determinaron por qPCR. $n = 4$ experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. $*p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. B) Los cultivos de neuronas corticales fueron estimulados con Bic + 4-AP durante 4 y 24 horas. Los niveles de mRNA de IGFR se determinaron por qPCR. $n = 4$ experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. $*p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. C) Las neuronas fueron transducidas con AAVs expresando GFP (control) o el dominante negativo A-CREB y estimuladas o no con Bic + 4-AP durante 4 horas. El nivel de expresión génica de IGF se analizó mediante qPCR. $n = 4$ experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. $*p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test *post hoc* de Tukey. D) Lactato liberado al medio por neuronas incubadas en presencia de IGF (100ng/ml) durante 24 horas. $n = 4$ experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. $*p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas.

Por todo lo descrito en los párrafos anteriores se consideró la posibilidad de que la actividad sináptica también estimulara la señalización dependiente de IGF1. La estimulación durante 4 y 24 horas con Bic + 4-AP incrementó la expresión de este factor de transcripción, pero no de su receptor (Figura 62 A, B). El patrón de expresión de IGF1 como respuesta a la actividad sináptica es muy parecido al seguido por Glut3 y Siah2 (Figura 30 A, Figura 42 A). Por lo tanto, se planteó la posibilidad de que también estuviese regulado por CREB. Tal como se esperaba, en los cultivos que expresaban el dominante negativo de CREB (A-CREB) se observó una reducción significativa en la expresión de IGF1 en las neuronas estimuladas (Figura 62 C). A pesar de todo, el tratamiento con la proteína recombinante humana IGF1 (Preprotech) de los cultivos primarios de neuronas corticales tan sólo causó un modesto incremento en los niveles de lactato en el medio (Figura 62 D). Por lo tanto, a pesar de que la actividad sináptica estimula la expresión de este factor de crecimiento mediante CREB, IGF1 por sí mismo no es capaz de estimular el metabolismo de la glucosa hasta el mismo nivel que la actividad sináptica.

8.8 La actividad sináptica y el transporte de mitocondrias en el axón.

8.8.1 La actividad sináptica estimula el transporte mitocondrial anterógrado.

Las mitocondrias juegan un papel clave tanto en el desarrollo como en homeostasis del cerebro (Mattson, Gleichmann and Cheng, 2008; Khacho and Slack, 2018; Son and Han, 2018). En las neuronas las mitocondrias llevan a cabo funciones tan relevantes como la regulación del Ca^{2+} , la generación de energía a partir de la cadena de transporte de energía o la regulación de la apoptosis (Mattson, Gleichmann and Cheng, 2008). En el soma se concentra la mayor parte de lisosomas y autosomas, motivo por el cual el proceso de mitofagia, necesario para la eliminación de las mitocondrias dañadas, tiene también lugar en el soma (Maday, Wallace and Holzbaur, 2012; Zheng *et al.*, 2019). Las neuronas tienen morfologías muy diversas. Pueden desarrollar extensiones de más de un metro. Entre las funciones de las mitocondrias, una de las principales es la generación del ATP necesario para asegurar la transmisión del impulso nervioso y promover el crecimiento neurítico (Pfenninger, 2009; Smith and Gallo, 2018).

Por este motivo las neuronas deberán ser capaces de transportar las mitocondrias desde el soma, donde sus componentes son sintetizados y donde finalmente son degradadas, hasta el cono axonal y viceversa. Las mitocondrias son transportadas a lo largo de los microtúbulos con la ayuda de diferentes proteínas como las quinesinas, encargadas del transporte anterógrado o las dineínas, del transporte retrogrado (Saxton *et al.*, 2012). El incremento de la biogénesis de mitocondrias mediante la sobreexpresión de PGC-1 α promueve el crecimiento axonal en cultivos de neuronas corticales (Vaarmann *et al.*, 2016). Tras la determinación del axón, las mitocondrias se concentran en el axón naciente, reduciendo su densidad en el resto de neuritas nacientes (Ruthel and Hollenbeck, 2003). Durante el crecimiento axonal, las mitocondrias se concentran en el cono axonal, incrementando los niveles de ATP en esta región (Ruthel and Hollenbeck, 2003; Vaarmann *et al.*, 2016; Trigo, Goncalves and Corcoran, 2019).

La actividad sináptica regula el transporte mitocondrial mediante diferentes mecanismos previamente descritos (Cai, Davis and Sheng, 2011; Sheng and Cai, 2012; Chen and Sheng, 2013). Para confirmar si la actividad sináptica podría estar regulando el transporte mitocondrial a través del axón, se analizó el movimiento mitocondrial en neuronas estimuladas y no estimuladas. A pesar de que la actividad sináptica no parece incrementar el movimiento mitocondrial total, sí que incrementa el movimiento anterógrado (Figura 63 A, B). Esto sugiere que la actividad sináptica estimula el transporte de mitocondrias hacia el cono axonal para permitir la generación de energía o la síntesis de determinados metabolitos. Entre los elementos implicados en la estimulación del movimiento anterógrado de mitocondrias a lo largo del axón se encuentra HIF-1 α (Y. Li *et al.*, 2009). La expresión del DN-HIF en neuronas estimuladas bloqueó el incremento en el transporte anterógrado observado en cultivos tratados con Bic + 4-AP (Figura 63 A, B). Estos resultados

sugieren que la actividad sináptica incrementa el transporte mitocondrial anterógrado a lo largo del axón mediante un mecanismo que depende de HIF-1 α .

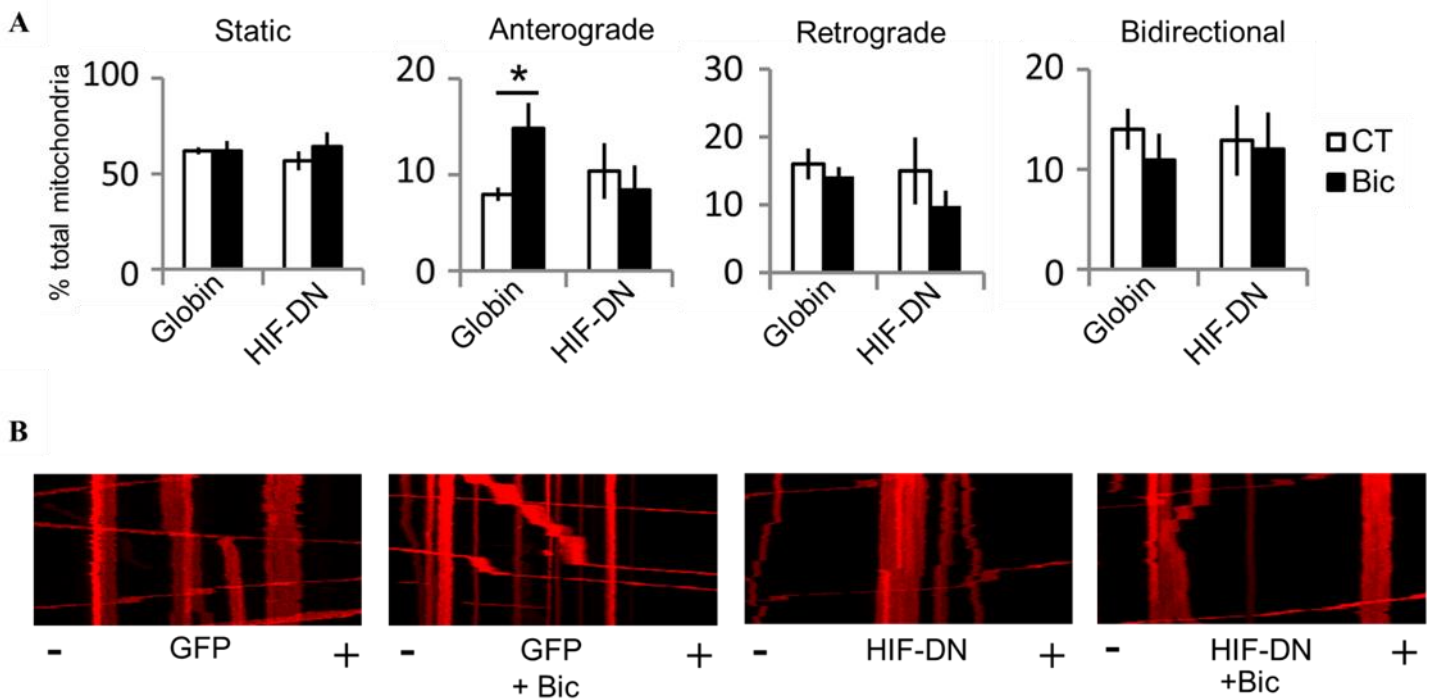


Figura 63: La actividad sináptica estimula el transporte mitocondrial anterógrado. A) Análisis del transporte mitocondrial en axones de neuronas corticales. Los cultivos de neuronas se transfectaron con un plásmido que codifica GFP, para marcar el citoplasma, con otro que codifica una RFP dirigida a mitocondrias (mitoRFP), para marcar las mitocondrias, y otro que codifica la proteína Globina (control) o el dominante negativo de HIF-1 α (HIF-DN). Tras 24 horas de incubación se estimularon durante 24 horas con Bic + 4-AP. Para analizar el movimiento mitocondrial se tomó una imagen de una determinada región del axón cada 2 segundos durante un total de cinco minutos. n= 15-20 neuronas de 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por el test post hoc de Tukey. B) Quimogramas representativos para cada condición del análisis de transporte mitocondrial. Los signos + y - hacen referencia a la dirección del transporte. + indica transporte anterógrado o hacia el cono axonal y - hace referencia a transporte retrógrado o hacia el soma.

8.8.2 La actividad sináptica estimula la expresión de MGARP mediante un mecanismo independiente de HIF-1 α .

MGARP es una proteína mitocondrial implicada en el transporte anterógrado de las mitocondrias cuya expresión aumenta en condiciones de hipoxia gracias a la activación de HIF-1 α (Y. Li *et al.*, 2009). Por este motivo se hipotetizó que la actividad sináptica podía estar regulando el movimiento mitocondrial mediante MGARP gracias a su sobreexpresión mediante un mecanismo dependiente de HIF-1 α .

Tal como se describe en la Figura 64 A, la actividad sináptica estimuló la expresión de MGARP tras 4 y 24 horas de estimulación. A pesar de lo esperado, la expresión del dominante negativo de HIF-1 α fue incapaz de bloquear este incremento en la transcripción de MGARP

(Figura 64 B). No obstante, cabe destacar que, aunque no se observa una reducción significativa en los niveles de MGARP tras la estimulación, sí se observa cierta tendencia.

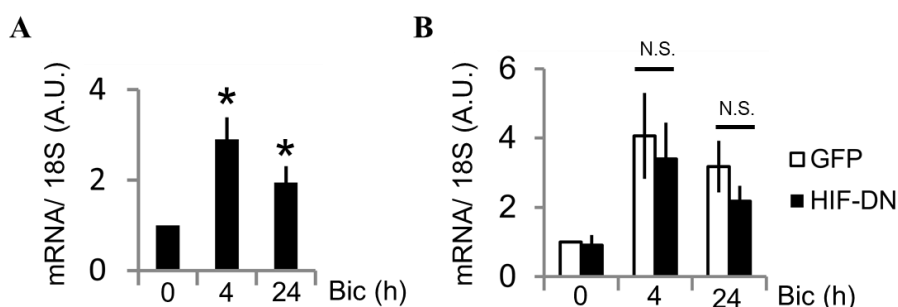


Figura 64: La actividad sináptica estimula la expresión de MGARP mediante un mecanismo independiente de HIF-1 α . A) Los cultivos de neuronas corticales fueron estimulados con Bic + 4-AP durante 4 y 24 horas. Los niveles de mRNA de MGARP se determinaron por qPCR. n= 4 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas. B) Los cultivos primarios de neuronas fueron transducidos con AAVs expresando HIF-DN o GFP (control) y estimulados o no durante 4 y 24 horas. La expresión de MGARP se analizó mediante qPCR. n= 5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por el test post hoc de Tukey.

8.9 La actividad sináptica y los peroxisomas.

8.9.1 La actividad sináptica regula la expresión de genes implicados el desarrollo y el metabolismo de los peroxisomas.

Los peroxisomas son orgánulos formados por una única membrana simple que juegan un papel clave en el metabolismo lipídico (Islinger *et al.*, 2018). Es en los peroxisomas donde tiene lugar la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga (≥ 22 carbonos) y la α -oxidación, la oxidación de ácidos grasos ramificados, así como la síntesis de diferentes clases de lípidos como los lípidos éter (Lodhi and Semenkovich, 2014). Los lípidos éter constituyen el 20% del total de los lípidos del cuerpo humano y son especialmente abundantes en el cerebro, el corazón y los leucocitos (Lodhi and Semenkovich, 2014). Hasta las dos terceras partes de los fosfolípidos con etanolamina como grupo polar presentes en el cerebro son plasmanlógico, uno de los principales lípidos éter (Nagan and Zoeller, 2001).

Los peroxisomas juegan además un papel clave en el correcto desarrollo del sistema nervioso (Berger *et al.*, 2016). Existen un gran número de síndromes relacionados con la deficiencia de alguno de los genes implicados en funcionamiento de los peroxisomas. El síndrome de Zellweger es causado por mutaciones en cualquiera de las proteínas PEX, implicadas en el mantenimiento de los peroxisomas. Este síndrome se caracteriza por ejemplo por problemas en la migración celular que acaban causando malformaciones a nivel de la corteza cerebral (Volpe and Adams,

1972). Los peroxisomas han sido previamente relacionados con el crecimiento neurítico. En los axones en crecimiento se ha observado un incremento en el transporte anterógrado de peroxisomas y en consecuencia una mayor densidad de peroxisomas en el cono de crecimiento (Ishikawa *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha comprobado que la alteración de la biogénesis peroxisomal como consecuencia de la delección de Pex14 afecta al desarrollo dendrítico de las células de Purkinje (Abe *et al.*, 2018). En este mismo estudio se observó que la reducción en la expresión de Pex5 reduce el crecimiento y desarrollo neurítico en células PC12.

Por estos motivos se decidió analizar la expresión de diferentes genes implicados en el mantenimiento y el metabolismo de los peroxisomas. Entre los genes estudiados se analizaron Pex5, implicado en el transporte de proteínas hasta el peroxisoma; Pex11a, implicada en la biosíntesis de nuevos peroxisomas; ACOT8, implicada en la oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga; ABCD2, encargada del transporte de ácidos grasos saturados e insaturados hasta el interior del peroxisoma; catalasa, encargada de la protección contra el daño oxidativo; y por último Pex13, encargada de la translocación de proteínas en la membrana del peroxisoma. Tras estimular los cultivos neuronales durante 4 y 24 horas con Bic + 4-AP se observó un incremento en la expresión de todos los genes descritos a excepción de la catalasa (Figura 65). Este resultado podría sugerir que la actividad sináptica estimula la generación de nuevos peroxisomas junto con el metabolismo lipídico de estos orgánulos.

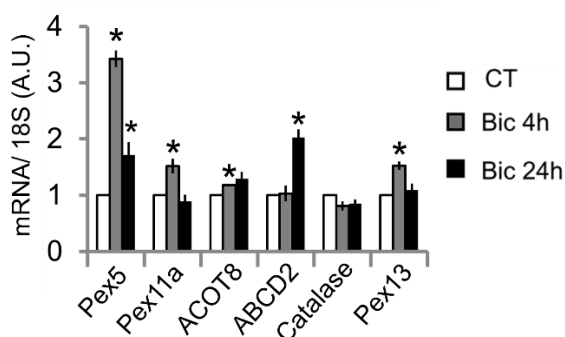


Figura 65: La actividad sináptica regula la expresión de genes implicados en el desarrollo y el metabolismo de los peroxisomas. Las neuronas corticales se estimularon o no con Bic + 4-AP durante 4 y 24 horas. Pasado este periodo de tiempo la expresión de mRNA de los genes indicados se determinó por qPCR. n= 3-5 experimentos independientes. Los valores representan la media \pm e.e.m. * $p < 0,05$, prueba t de Student de dos colas.

9. DISCUSIÓN

A lo largo de esta tesis se han mostrado evidencias de que el crecimiento neurítico promovido por la actividad sináptica depende de la estimulación del metabolismo de la glucosa. Los resultados indican que la actividad sináptica induce el transporte y el metabolismo de la glucosa, que será en parte destinada a la síntesis de lípidos, necesarios para la generación de las nuevas membranas utilizadas en el crecimiento de dendritas y axones. La estimulación del metabolismo de la glucosa tiene lugar a nivel transcripcional, gracias a la actividad del factor de transcripción CREB, que promueve la expresión del transportador de glucosa Glut3 y de la E3 ubiquitina-ligasa Siah2. Esta última, promueve la estabilización en condiciones de normoxia de HIF-1 α , que finalmente activa la expresión de las enzimas encargadas de regular los pasos limitantes de la glucólisis (Figura 66 A, B).

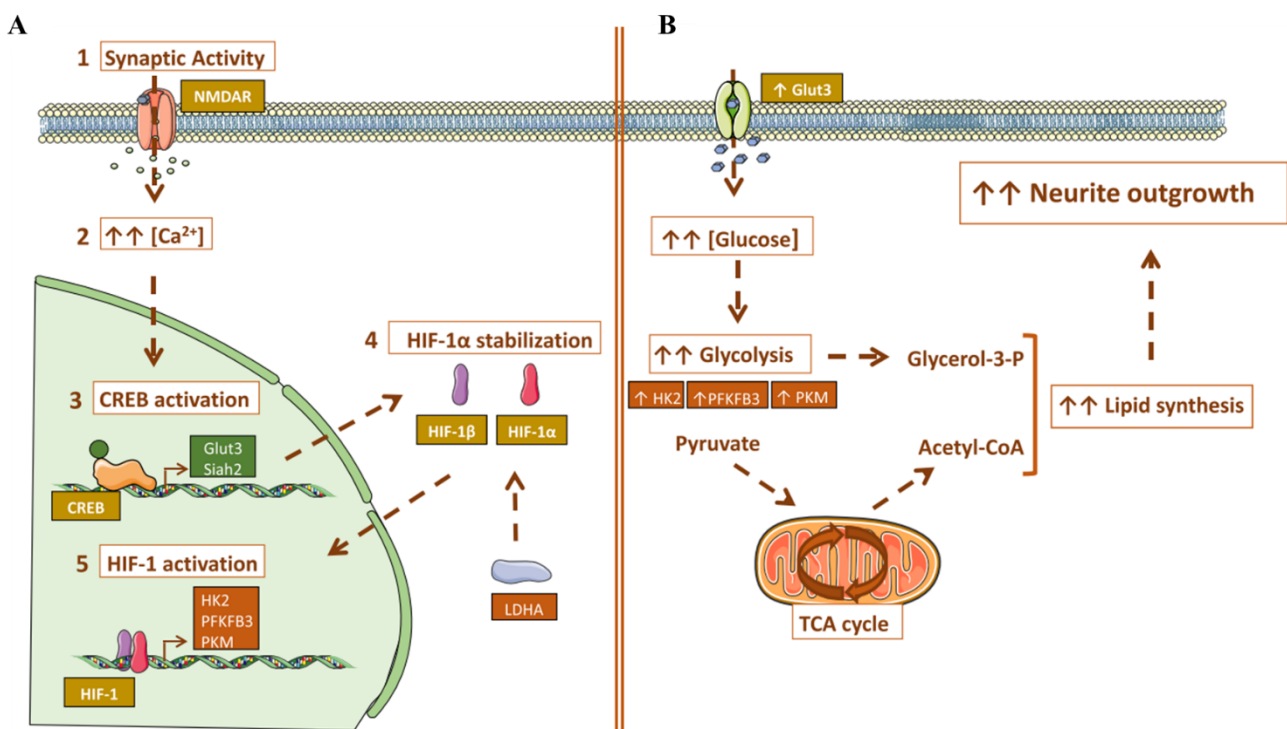


Figura 66: Modelo del mecanismo por el cual la actividad sináptica promueve el metabolismo de la glucosa con el objetivo de sintetizar los lípidos necesarios para promover el crecimiento neurítico. A) La actividad sináptica estimula el metabolismo de la glucosa a nivel transcripcional: La actividad sináptica (1) estimula la entrada de Ca^{2+} al citoplasma (2) que activa el factor de transcripción CREB (3). CREB induce la transcripción del transportador de glucosa Glut3. Al mismo tiempo CREB induce la expresión de Siah2 que con la ayuda de la actividad de LDH promueve la estabilización y como consecuencia la activación de HIF-1 α (4), que finalmente estimula la expresión de los genes que codifican las enzimas que catalizan los pasos limitantes de la glucólisis (5). B) Los cambios a nivel transcripcional causados por la actividad sináptica incrementan la captación de glucosa y estimulan la actividad glicolítica. Como resultado, se incrementa la síntesis de los metabolitos como acetil-CoA que serán finalmente utilizados en la síntesis de los lípidos necesarios para la generación de las nuevas membranas utilizadas para asegurar el crecimiento neurítico. Algunas de las figuras utilizadas en este esquema se han obtenido y modificado a partir de Smart Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

9.1 La actividad sináptica estimula el metabolismo glucolítico con el objetivo de sintetizar los lípidos utilizados en la síntesis de las nuevas membranas destinadas al crecimiento neurítico.

La señalización aferente juega un papel esencial en el crecimiento de dendritas y axones (Rajan and Cline, 1998; Groc *et al.*, 2002; Wong and Ghosh, 2002). A pesar de que las vías de señalización implicadas en el crecimiento neuronal han sido ampliamente estudiadas se sabe muy poco sobre las vías metabólicas implicadas. El cerebro es el mayor consumidor de glucosa en el cuerpo humano. A pesar de representar tan solo el 2% del peso total, consume hasta el 20% de la energía derivada de la glucosa (Mergenthaler *et al.*, 2013). La mayor parte de la glucosa en el cerebro es completamente oxidada con el objetivo de generar las grandes cantidades de ATP necesarias para mantener los gradientes iónicos y los diferentes procesos relacionados con la regulación de transmisión sináptica (Harris, Jolivet and Attwell, 2012; Rangaraju, Calloway and Ryan, 2014; Magistretti and Allaman, 2015). Sin embargo, el análisis del consumo de glucosa y oxígeno en el cerebro humano demuestra que la cantidad total de glucosa consumida está en exceso con respecto al consumo de oxígeno (Vaishnavi *et al.*, 2010; Goyal *et al.*, 2014). La utilización de la glucólisis aerobia en el cerebro humano varía durante el desarrollo, mientras que tras el nacimiento el 35% de la glucosa se consume únicamente por esta vía, este porcentaje cae durante el crecimiento hasta que en la edad adulta está entre el 10 y el 12% (Goyal *et al.*, 2014). Este incremento en la glucólisis aeróbica durante la infancia coincide con el periodo durante el desarrollo postnatal de mayor tasa de crecimiento neurítico (Goyal *et al.*, 2014; Silbereis *et al.*, 2016).

Estudios previos han demostrado que durante el proceso de diferenciación neuronal *in vitro* el tratamiento con el inhibidor de la glucólisis 2-DG a DIV1 es capaz de inhibir completamente el desarrollo de dendritas y axones (Agostini *et al.*, 2016). En este mismo estudio se demostró que, a pesar de que durante el desarrollo neuronal se incrementa el número de mitocondrias, la actividad mitocondrial es proporcionalmente menor. En cultivo, las neuronas empiezan a desarrollar las primeras sinapsis alrededor de DIV7 (Ichikawa *et al.*, 1993), a diferencia de los experimentos llevados a cabo por Agostini y colaboradores, los experimentos con cultivos neuronales mostrados en esta tesis se llevaron a cabo cuando las neuronas ya habían establecido las primeras sinapsis. A pesar de esta diferencia en el modelo experimental, los datos presentados en esta tesis doctoral muestran que el metabolismo glucolítico es necesario tanto para el crecimiento axonal *in vitro* como para el dendrítico *in vivo*. Es decir, la activación del metabolismo de la glucosa es necesaria para la síntesis de las moléculas precursoras para la generación de nuevas membranas sin importar si estas serán destinadas al crecimiento axonal o

dendrítico, sin embargo, los experimentos realizados a lo largo del presente trabajo indican que este cambio a nivel metabólico no estimula el crecimiento axonal o dendrítico por sí.

Una de las principales características de las células tumorales es la reprogramación metabólica, pasando de un metabolismo más oxidativo, propio de células quiescentes, a un metabolismo más glucolítico, característico de células en proliferación (Hanahan and Weinberg, 2011). Esta adaptación metabólica, conocida con el nombre de efecto Warburg, les permite generar energía de forma más rápida, aunque menos eficiente, y lo que es más importante, les permite obtener los precursores básicos necesarios para la síntesis de la gran mayoría de biomoléculas (Heiden, Cantley and Thompson, 2009). Este efecto ha sido observado en otros tipos celulares como los linfocitos, macrófagos y células dendríticas durante la respuesta inmunológica, en las células endoteliales durante el proceso de angiogénesis o en las células madre durante su mantenimiento y proliferación (Frauworth *et al.*, 2002; Shyh-Chang, Daley and Cantley, 2013; Kelly and O'Neill, 2015; Palsson-Mcdermott *et al.*, 2015; Draoui, de Zeeuw and Carmeliet, 2017; Salmond, 2018). También se ha observado en la reprogramación de células somáticas para obtener las denominadas células madre pluripotentes inducidas (iPSc, por sus siglas en inglés) (Panopoulos *et al.*, 2012; Mathieu and Ruohola-Baker, 2017). Entre los primeros genes cuya expresión se ve estimulada durante el proceso de reprogramación celular se encuentra un gran número de genes implicados en la regulación del metabolismo (Cacchiarelli *et al.*, 2015). A diferencia de las células tumorales, las neuronas adultas no proliferan, basan su crecimiento en la extensión de dendritas y axones. Una neurita con un diámetro de 1 μm que se extiende a un ritmo de 0,55 $\mu\text{m}/\text{día}$ debe expandir su superficie a un ritmo de alrededor de 1 $\mu\text{m}^2/\text{min}$ para alcanzar finalmente los 250000 μm^2 , la superficie típica de una neurona. La cantidad de nuevas membranas necesarias será por lo tanto mucho mayor en comparación con una célula esférica, cuya área total será 1256 μm^2 en el caso de tener un diámetro de 20 μm (Pfenninger, 2009).

La mayor parte de proteínas y lípidos utilizados en el crecimiento neuronal son sintetizados en el soma, donde son incorporados en las denominadas vesículas precursoras del plasmalema (PPVs, por sus siglas en inglés) (Goldberg, 2003; Pfenninger, 2009). Las PPVs pueden fusionarse tanto con determinadas regiones a lo largo del axón como con el cono de crecimiento, todo depende de su composición (Pfenninger, 2009). Por ejemplo, se ha comprobado que las PPVs que contienen el IGFR son dirigidas específicamente al cono axonal (Pfenninger *et al.*, 2003). A pesar de que la síntesis de lípidos tiene lugar principalmente en el soma, también se ha comprobado que determinados lípidos como la fosfatidilcolina pueden ser sintetizados en el cono de crecimiento (Vance, Campenot and Vance, 2000). Algunos como el esqueleto de glicerol tan solo pueden ser sintetizados en el soma (Pfenninger and Johnson, 1983), no obstante tras comparar el proteoma del soma y del cono de crecimiento de neuronas de la corteza cerebral de ratones durante el desarrollo postnatal se observó que los niveles de las enzimas ACLY y FASN eran hasta 4

veces superiores en el cono axonal. Esto sugiere que los ácidos grasos podrían ser sintetizados también localmente (Poulopoulos *et al.*, 2019). A pesar de que no se ha determinado su localización celular (soma o cono axonal), en esta tesis se ha demostrado que la estimulación sináptica promueve la síntesis de estas dos enzimas junto con la incorporación de glucosa en lípidos y la síntesis del acetil-CoA, el principal precursor en la síntesis de ácidos grasos. El acetil-CoA utilizado en células eucariotas puede tener diferentes orígenes, desde la β -oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria hasta la acetilación del CoA en el citoplasma, sin embargo una de las principales fuentes de acetil-CoA es la glucosa (Pietrocola *et al.*, 2015). Tal como se ha demostrado en este estudio, las neuronas incubadas en un medio sin glucosa no experimentaban un incremento en los niveles de acetil-CoA tras estimularlas sinápticamente. Al igual que en células tumorales, en neuronas la síntesis de este metabolito, y en consecuencia el crecimiento y la generación de nuevas membranas, depende de la enzima ACLY (Zaidi, Swinnen and Smans, 2012). Esta enzima es la encargada de catalizar la conversión del citrato citoplasmático en acetil-CoA. En células cancerígenas su inhibición es capaz de reducir el crecimiento tumoral (Hatzivassiliou *et al.*, 2005; Migita *et al.*, 2008). El citrato utilizado proviene en su mayor parte de la mitocondria, donde es sintetizado a partir del oxalacetato y del acetil-CoA, obtenido a partir del piruvato proveniente de la glucólisis (Lunt and Vander Heiden, 2011).

La utilización del citrato mitocondrial en la síntesis de lípidos hace que sea necesario la existencia de reacciones anapleróticas que se encarguen de la síntesis de intermediarios del ciclo de Krebs para asegurar su continuo funcionamiento. Una de las principales moléculas implicadas es la glutamina. La glutamina es captada directamente del medio de cultivo y desaminada por la glutaminasa (GLS), dando lugar al aminoácido glutamato que finalmente dará lugar al 2-OG. Este conjunto de reacciones puede tener lugar tanto en la matriz mitocondrial como en el citoplasma. En el primer caso, el 2-OG generado puede ser incorporado en el ciclo de Krebs, actuando por lo tanto de vía anaplerótica, mientras que en el segundo caso es utilizado para la síntesis de citrato directamente en el citoplasma (Yang, Venneti and Nagrath, 2017). El citrato sintetizado por la vía citoplasmática puede ser directamente transformado por la ACLY en acetil-CoA y finalmente utilizado en la síntesis de ácidos grasos (Mullen *et al.*, 2012; Sun and Denko, 2014). Tras analizar la incorporación de glutamina a lípidos en neuronas estimuladas no se observó ningún cambio, por lo tanto, hecho que sugiere que en las neuronas estimuladas sinápticamente la glutamina es utilizada para mantener los niveles de los diferentes metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs mientras que la glucosa es utilizada en la síntesis de acetil-CoA.

Como se ha comentado previamente, el efecto Warburg, observado en células tumorales, se caracteriza por un incremento en la glucólisis aeróbica. Este cambio a nivel metabólico tiene lugar principalmente a nivel transcripcional y se caracteriza por un incremento en la expresión de los transportadores de glucosa, de la enzima hexoquinasa, de PKM2 y de las enzimas PDKs, entre

otras (Burns and Manda, 2017). Tras caracterizar la expresión génica de las neuronas estimuladas observamos un incremento en la expresión de estos genes, que se correspondió con un incremento en el consumo y el metabolismo de la glucosa. Agostini y colaboradores durante el estudio del proceso de diferenciación neuronal *in vitro* ya observaron un incremento en la síntesis de diferentes enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa como Glut3 y PFK1 (Agostini *et al.*, 2016). Durante la realización de esta tesis doctoral se publicó un trabajo que ya describía la estimulación del metabolismo de la glucosa por la actividad sináptica (Bas-Orth *et al.*, 2017). Mediante el uso de cultivos primarios de neuronas de hipocampo describieron como la estimulación con Bic + 4-AP incrementa la expresión de diferentes genes implicados en el metabolismo a nivel glucolítico y mitocondrial.

La transmisión del impulso nervioso requiere grandes cantidades de energía en forma de ATP, debido, por ejemplo, al mantenimiento de los gradientes de iones (Harris, Jolivet and Attwell, 2012). Las mitocondrias juegan un papel clave en este proceso, a parte de en la generación de energía en la regulación de los niveles de Ca^{2+} en la sinapsis. Son capaces de captar el Ca^{2+} acumulado en el citoplasma mediante el uniportador mitocondrial de calcio (MCU, por sus siglas en inglés) y acumularlo en su interior (White *et al.*, 1996; Zenisek and Matthews, 2000; Barstow *et al.*, 2004; Marland *et al.*, 2016).

El complejo enzimático PDH, localizado mayormente en la matriz mitocondrial, es el encargado de catalizar la conversión del piruvato en acetil-CoA para su incorporación al ciclo de Krebs. La actividad de este complejo es inhibida por la fosforilación de su subunidad homónima por las enzimas PDKs. Esta inhibición se puede revertir gracias a la acción de la fosfatasa PDP (Lunt and Vander Heiden, 2011). Se ha observado que el aumento en los niveles de Ca^{2+} mitocondrial puede promover la actividad la PDP y en consecuencia de la PDH. Las PDH defosforilada tiene una mayor actividad, genera una mayor cantidad de acetil-CoA y por lo tanto promueve la actividad del ciclo de Krebs (Denton, Randle and Martin, 1972; Denton, 2009). El incremento en los niveles de Ca^{2+} mitocondrial también incrementa la actividad de determinadas enzimas del ciclo de Krebs como son la IDH y de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH) que estimulan la actividad de esta vía y promueven la síntesis de metabolitos como el fumarato y el malato al mismo tiempo que reducen la cantidad de citrato (Hutto *et al.*, 2019). Durante los primeros 10 minutos de estimulación neuronal con Bic + 4-AP se observa una rápida caída en los niveles de PDH fosforilada que es de nuevo fosforilada con el tiempo (Bas-Orth *et al.*, 2017). Este efecto podría estar relacionado con la sobreexpresión de Pdk1 y Pdk3 observada tras 4 y 24 horas de estimulación con Bic + 4-AP. El acetil-CoA es incorporado al ciclo de Krebs promoviendo por un lado su actividad y, en consecuencia, la generación de energía a partir de la cadena de transporte de electrones, y por otro, la generación de citrato destinado a la síntesis de lípidos. La rápida defosforilación de PDH podría estar relacionada con la entrada de Ca^{2+} y la

consecuente activación de PDP y en consecuencia con un rápido incremento en el metabolismo oxidativo con el objetivo de sintetizar energía en forma de ATP destinada al mantenimiento de los gradientes de iones. A pesar de que la actividad PDH es necesaria para la síntesis de acetil-CoA mitocondrial y por lo tanto en la síntesis de citrato mitocondrial, el incremento en la síntesis de las PDKs podría estar relacionado con el control de la sobreactivación del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones, que podría tener como consecuencia un incremento en los ROS.

El incremento en la síntesis de acetil-CoA acompañado del aumento en la expresión de las PDKs ha sido recientemente descrito en otro modelo experimental (Yucel *et al.*, 2019). Durante el proceso de regeneración de músculo esquelético el metabolismo glucolítico se incrementa para permitir la síntesis de acetil-CoA destinado a la acetilación de proteínas histona. Entre los genes sobreexpresados se encuentran las isoformas Pdk2 y Pdk4. La delección de estas enzimas inhibe todo el proceso de regeneración muscular. Como consecuencia los autores señalan que ambas enzimas podrían jugar un papel clave en la regulación del nivel de acetilación de las histonas a nivel enzimático, puesto que su inhibición durante la replicación de las células progenitoras inhibía su diferenciación, caracterizada por una reducción en el nivel de acetilación de determinadas histonas.

Entre las enzimas estudiadas encontramos PFKFB3, la enzima encargada de sintetizar la fructosa-2,6-bisfosfato, el principal activador alostérico de la PFK1 (Lunt and Vander Heiden, 2011). Herrero-Mendez y colaboradores han mostrado que en las neuronas esta enzima es degradada de forma constitutiva por el proteasoma, lo que permitiría a la neurona destinar toda la glucosa a la PPP y, por lo tanto, reducir el estrés oxidativo mediante la regeneración de GSH (Herrero-Mendez *et al.*, 2009). En esta misma publicación observaron que la estimulación de la glucólisis por la sobreexpresión de esta enzima reducía la cantidad de glucosa metabolizada en la PPP y como consecuencia incrementaba la muerte neuronal por apoptosis debido a un incremento en el estrés oxidativo. Sin embargo, a lo largo de esta tesis se ha demostrado tanto que la actividad sináptica estimula el transporte y el metabolismo de la glucosa como que la glucosa debe ser necesariamente procesada por la glucólisis para poder ser destinada a la síntesis de lípidos. El análisis por *Western blot* de los niveles de PFKFB3 en cultivos neuronales, llevado a cabo en el presente estudio, fue capaz de detectar esta proteína tanto en cultivos estimulados como en reposo.

A lo largo de esta tesis se ha demostrado que la actividad sináptica promueve la glucólisis estimulando la síntesis de diversas enzimas de esta vía, entre las que se encuentran PFKFB3. Estudios previos han demostrado que la actividad sináptica, estimulada mediante el tratamiento combinado con Bic y 4-AP, promueve la supervivencia neuronal bien inhibiendo diferentes estímulos pro-apoptóticos, inhibiendo la expresión de proteínas como Puma, Apaf-1 o la

procaspasa 9, o bien activando diferentes defensas contra el daño oxidativo, como por ejemplo la actividad tioredoxina (Papadia *et al.*, 2008; Léveillé *et al.*, 2010). Por lo tanto, los cambios en el metabolismo inducidos por la actividad sináptica van acompañados por cambios en las vías implicadas en la supervivencia neuronal y en la defensa contra el daño oxidativo. Sin embargo, en el estudio de Herrero-Mendez (Herrero-Mendez *et al.*, 2009), la activación del metabolismo de la glucosa mediante la sobreexpresión de PFKFB3 no va acompañada de ningún cambio en las defensas contra el estrés oxidativo. El incremento en el consumo de glucosa por la glucólisis conlleva una reducción en el consumo de glucosa por la vía de las PPP, una de las principales fuentes de antioxidantes de la célula. Por este motivo, en el caso de no ir acompañada de la activación de otras defensas contra el daño oxidativo, la activación de la glucólisis podría llevar a la muerte neuronal debido al daño oxidativo.

Entre los factores de transcripción implicados en la regulación del metabolismo de la glucosa durante el crecimiento se encuentran desde Myc, a NFκB o incluso OCT1 (Burns and Manda, 2017). Sin embargo, el más destacado es sin duda HIF-1α. HIF-1α es conocido como el principal factor de transcripción implicado en la respuesta a hipoxia. Los genes implicados con el metabolismo de la glucosa representan el mayor grupo funcional regulado por este factor de transcripción (Semenza *et al.*, 1994). La delección de HIF-1α es letal en el estadio E11 del desarrollo en ratones, debido a la aparición de malformaciones a nivel cardiovascular y cerebral (Iyer *et al.*, 1998; Ryan, Lo and Johnson, 1998). Su KO en progenitores neuronales causa diferentes problemas en el desarrollo cerebral que tienen como consecuencia hidrocefalia, una marcada reducción en el número de neuronas y la aparición de defectos en la memoria espacial (Tomita *et al.*, 2003). En adultos es también necesario para el mantenimiento de la población de células madre neuronales de la SVZ (Li *et al.*, 2014). No obstante, su delección específica en neuronas maduras mediante la construcción CaMKII-CRE no causa defectos aparentes a nivel morfológico aunque sí juega un papel clave en la regeneración axonal (Helton *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2015; Alam *et al.*, 2016). En esta tesis, se demuestra que la delección de HIF-1α durante las primeras fases del desarrollo en ratones, el periodo de mayor crecimiento neurítico y de mayor tasa de sinaptogénesis (Silbereis *et al.*, 2016), causa problemas en la arquitectura dendrítica en el adulto.

A lo largo de esta tesis también se ha demostrado que HIF-1α regula la incorporación de glucosa en lípidos en cultivos neuronales estimulados sinápticamente. La actividad sináptica estimula la síntesis de enzimas implicados en la síntesis de ácidos grasos como FASN (Choi *et al.*, 2008; Furuta *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2012). Diferentes estudios previos han relacionado HIF-1α con la regulación del metabolismo lipídico (Shen and Li, 2017; Mylonis, Simos and Paraskeva, 2019). La activación de HIF-1α mediante diferentes mecanismos, como la hipoxia, es capaz de estimular la captación y el almacenamiento de lípidos induciendo la síntesis de diferentes

proteínas implicadas en el transporte de lípidos (Krishnan *et al.*, 2009; Bensaad *et al.*, 2014). Ha sido establecida cierta relación entre la regulación de FASN y la actividad de HIF-1 α (Furuta *et al.*, 2008). En cultivos de células de cáncer de mama humano se ha observado que en condiciones de hipoxia HIF-1 α promueve la expresión de FASN. Sin embargo, en células HEK 293 sometidas a hipoxia se ha observado el efecto contrario (Choi *et al.*, 2008). Este efecto podría ser dependiente del tipo celular. Por otro lado HIF-1 α es capaz de inhibir la β -oxidación de ácidos grasos, favoreciendo la síntesis de lípidos (Boström *et al.*, 2006; Krishnan *et al.*, 2012).

HIF-1 α puede cooperar con PPAR- γ , un factor de transcripción clave en la regulación del metabolismo lipídico, para promover la acumulación de TCAs durante la hipertrofia cardíaca (Krishnan *et al.*, 2009). En estas condiciones, HIF-1 α activa la transcripción de PPAR- γ , el cual estimula la expresión de GPD1 y GPAT (Patsouris *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2006; Krishnan *et al.*, 2009). La primera es la encargada de catalizar la conversión de la DHAP, uno de los intermediarios de la glucólisis, en glicerol-3-fosfato que es a continuación utilizado por la GPAT en la síntesis de DAGs y TAGs (Gonzalez-Baró, Lewin and Coleman, 2007). El incremento en el consumo de DHAP por el incremento en la GPD1 incrementa la actividad de la glucólisis (Krishnan *et al.*, 2009). Por último algunos estudios sugieren que HIF-1 α también podría jugar cierto papel en la síntesis de colesterol (Mukodani, Ishikawa and Fukuzaki, 1990; Pallottini *et al.*, 2008; Parathath *et al.*, 2011). En el futuro sería muy interesante estudiar con más detalle los lípidos concretos cuya síntesis se ve estimulada por la actividad sináptica.

La activación de HIF-1 α está regulada a múltiples niveles (Majmundar, Wong and Simon, 2010; Cavadas, Nguyen and Cheong, 2013; Iommarini *et al.*, 2017). Durante esta tesis se ha observado que la actividad sináptica reduce la actividad de las PHD al mismo tiempo que CREB estimula la expresión de la E3 ubiquitina ligasa Siah2 cuya activación por la actividad sináptica es necesaria para la estabilización de HIF-1 α . El ratón KO de Siah2 no presenta malformaciones severas en el cerebro (Frew *et al.*, 2003). Sin embargo, la presencia de otras proteínas Siah (1a y 1b) podrían explicar esta falta de fenotipo, puesto que en el animal doble KO Siah1a/Siah2 se observa un fenotipo mucho más severo con respecto a la actividad de HIF-1 α que los ratones Siah2 KO (Nakayama *et al.*, 2004).

Siah2 puede estabilizar los niveles de HIF-1 α mediante la degradación de las PHDs (Nakayama *et al.*, 2004). Sin embargo, en experimentos llevados a cabo por Sergi Casellas no se observó ninguna reducción en los niveles de las proteínas PHDs tras la estimulación sináptica (Segarra-Mondejar *et al.*, 2018). HIF-1 α es conocido por interactuar con más de un centenar de proteínas (Semenza, 2017), la mayoría de las cuales está implicada en la regulación de la estabilidad de HIF-1 α . Entre las proteínas con las que interactúa, algunas de ellas son sustratos de Siah2, como PLK3, que fosforila y desestabiliza HIF-1 α (Xu *et al.*, 2010), y la degradación de

PLK3 por Siah2 tiene como consecuencia la activación de HIF-1 α (Li *et al.*, 2017). Sprouty2 induce la ubiquitinación de HIF-1 α (Hicks and Patel, 2016) y está regulado por Siah2 (Qi *et al.*, 2008), y la represión de su expresión incrementa el crecimiento axonal (Marvaldi *et al.*, 2015). Sin embargo, la conexión entre estas tres observaciones todavía no se ha establecido. Se ha demostrado que un incremento en los niveles de piruvato y su consecuente incremento en los niveles de lactato pueden estabilizar HIF-1 α (Lu, Forbes and Verma, 2002). En un trabajo derivado de esta tesis se comprobó que la inhibición de LDH mediante el tratamiento con oxamato bloqueó casi completamente la estabilización de HIF-1 α debido a la actividad sináptica (Segarra-Mondejar *et al.*, 2018). Dado que este mismo efecto fue observado en los cultivos KD de Siah2 es posible afirmar que ambas proteínas forman parte de la misma vía de regulación de HIF-1 α .

La activación de CREB como consecuencia de la estimulación sináptica es también clave para la inducción del metabolismo de la glucosa. En neuronas, CREB es un factor de transcripción clave en la regulación de plasticidad, supervivencia y crecimiento neuronal (Lonze and Ginty, 2002; Redmond, Kashani and Ghosh, 2002; Greer and Greenberg, 2008; Bading, 2013). En tejidos periféricos, CREB regula el metabolismo glucolítico y lipídico en los tejidos sensibles a insulina (Altarejos and Montminy, 2011). Tal como se ha demostrado previamente (Rajakumar *et al.*, 2004), en esta tesis se ha demostrado que CREB promueve la expresión del gen que codifica Glut3, el principal transportador de glucosa en neuronas. También se ha observado que CREB induce la expresión del gen Siah2 y, como consecuencia, la estimulación de HIF-1 α , lo que resulta en el incremento en la expresión génica de las enzimas que catalizan los pasos limitantes de la glucólisis. Un estudio reciente ha demostrado que PKA, una de las enzimas implicadas en la activación de CREB por fosforilación, puede estimular la estabilización y la consecuente activación de HIF-1 α mediante la fosforilación de sus residuos Treonina-63 y Serina-692 (Bullen *et al.*, 2016). Este mecanismo de regulación es independiente de la hidroxilación de las prolinas localizadas en el dominio ODD. Sería muy interesante evaluar en un futuro si este mecanismo también podría estar implicado en la regulación de HIF-1 α por la actividad sináptica.

La reducción del crecimiento dendrítico es una de los principales marcadores de discapacidad mental (Moser, 1999). Al igual que en nuestro estudio, la mayoría de estudios relacionando ambos conceptos se han llevado a cabo analizando la densidad dendrítica en neuronas piramidales de la corteza cerebral. El papel del esqueleto de actina en el mantenimiento y crecimiento del árbol dendrítico y las consecuencias derivadas de su alteración han sido ampliamente estudiados (Lin and Koleske, 2010; Z. Yan *et al.*, 2016). Sin embargo, poco se sabe sobre el papel del metabolismo de la glucosa en el crecimiento neuronal. Existen dos situaciones en las que el desarrollo del cerebro tiene lugar en condiciones de baja concentración de glucosa, en el caso de la existencia de mutaciones que disminuyen la actividad de Glut1, el principal transportador de glucosa a través de la BBB, o en el caso de problemas en la regulación de glucosa en sangre que causen

hipoglicemia crónica o infantil. Ambos casos se han relacionado con epilepsia, con un retraso en el desarrollo y con discapacidad intelectual (Pascual *et al.*, 2007). En esta tesis no se ha analizado el comportamiento de los animales cuyo metabolismo glucolítico ha sido inhibido durante las primeras etapas del desarrollo. No obstante, sería muy interesante estudiar si su inhibición y la consecuente reducción en la densidad dendrítica tiene finalmente un efecto en el correcto desarrollo cognitivo y motor del animal.

La aparición de diferentes enfermedades neurodegenerativas también se ha relacionado con una reducción en el consumo cerebral de glucosa. El proceso de envejecimiento se ha relacionado con una disminución en el consumo de glucosa por el cerebro (Goyal *et al.*, 2017). Se ha descrito cierta relación entre el nivel de acumulación de proteína tau y el nivel de glucólisis aeróbica en los cerebros de personas durante las primeras fases de la enfermedad de Alzheimer (Vlassenko *et al.*, 2018). Tal como se ha visto, la glucólisis es necesaria tanto para la generación de la energía necesaria para mantener diferentes procesos neuronales como la transmisión del impulso nervioso (Rangaraju, Calloway and Ryan, 2014), como para la síntesis de diferentes metabolitos precursores para la síntesis de biomoléculas, como fosfolípidos o aminoácidos, necesarias para mantener los procesos y las diferentes estructuras neuronales (Lunt and Vander Heiden, 2011).

9.2 La activación del metabolismo de la glucosa tiene lugar en las neuronas estimuladas.

Astrocitos y neuronas están metabólicamente acoplados (Yellen, 2018). De acuerdo con la hipótesis de la ANLS el lactato producido por los astrocitos es liberado al medio y captado por las neuronas para obtener energía mediante su oxidación en la mitocondria (Pellerin and Magistretti, 1994). A pesar de que existe una larga lista de pruebas a favor de esta teoría también existe un gran número de datos en su contra (Pellerin and Magistretti, 2012; A. B. Patel *et al.*, 2014; Lundgaard *et al.*, 2015; Dienel, 2017). A lo largo de esta tesis se ha comprobado que: 1) la actividad sináptica estimula el transporte y el metabolismo de la glucosa específica en neuronas, y no en células gliales, incrementando la expresión de Glut3 y de los genes de la glucólisis; 2) tras incrementar la proporción de células de la glía en cultivos primarios de neuronas corticales no tiene lugar incremento alguno en la liberación de lactato cuando los cultivos eran estimulados; 3) el tratamiento con BDNF no estimula la liberación de lactato en cultivos puros de glía a pesar de que sí la estimula en cultivos neuronales mixtos. En la misma línea que estos resultados cabe destacar que el análisis de la captación de glucosa se llevó a cabo mediante microscopía confocal, hecho que permitió estudiar el transporte específicamente en neuronas. Por otro lado el análisis

de la actividad transcripcional de HIF-1 α mediante la expresión del gen reportero luciferasa se realizó transfectando los cultivos mediante un protocolo basado en la transfección específica de neuronas (Soriano *et al.*, 2008), con lo que la gran mayoría de células transfectadas son neuronas. De acuerdo con los resultados presentados, un estudio reciente (Bas-Orth *et al.*, 2017) demostró que la actividad sináptica causa un incremento en la transcripción de los genes de la glucólisis junto con un consecuente aumento en la actividad glicolítica. El aislamiento de neuronas por FACS permitió a los autores de este estudio concluir que la estimulación de la síntesis de los genes de la glucólisis ocurría específicamente en neuronas. Este mismo efecto se ha observado *in vivo*, donde se comprobó por microscopia de excitación por dos fotones que la glucosa cerebral es principalmente consumida por las neuronas (Lundgaard *et al.*, 2015).

A pesar del gran número de pruebas que indican que la actividad sináptica estimula el metabolismo de la glucosa en neuronas estos resultados no se oponen directamente a la ANLS, tan solo demuestran que las neuronas pueden tomar glucosa del medio y metabolizarla en la glucólisis (Zala *et al.*, 2013; Lundgaard *et al.*, 2015; Jang *et al.*, 2016; Ashrafi and Ryan, 2017; Díaz-García *et al.*, 2017). La división celular, la migración y el crecimiento neurítico necesitan una gran cantidad de energía, lo que explica por qué las neuronas no dependen únicamente del lactato liberado por los astrocitos durante el desarrollo pre y postnatal.

Este mismo efecto también ha sido observado en el suministro de colesterol de astrocitos a neuronas. Durante la edad adulta todo el colesterol utilizado por las neuronas es suministrado por los astrocitos, sin embargo durante la fase de máximo crecimiento neurítico del desarrollo los astrocitos solos son incapaces de suministrar todo el colesterol necesario (Funfschilling *et al.*, 2012).

9.3 La actividad sináptica estimula la expresión de IGF1 mediante el factor de transcripción CREB.

El factor de crecimiento IGF1 es un polipéptido estructuralmente similar a la insulina (Hakuno and Takahashi, 2018). Tras interactuar con su receptor promueve la activación de diferentes cascadas de señalización entre las que se encuentra la vía de las MAP quinasas como la vía de la PI3K (Wrigley, Arafa and Tropea, 2017). IGF1 es esencial para el desarrollo de diferentes tejidos. Los ratones homocigotos para una forma no funcional de este factor de crecimiento experimentan un menor crecimiento corporal, un mayor nivel de mortalidad postnatal y, en algunos casos, problemas en el proceso de osificación (Liu *et al.*, 1993). A nivel de CNS, la sobreexpresión de IGF1 en ratones incrementa el crecimiento del cerebro durante el desarrollo

prenatal y postnatal, mientras que los ratones KO para esta proteína presentan una reducción en el tamaño del cerebro junto con una reducción en la densidad axonal en determinadas regiones como el cuerpo calloso o la comisura anterior (Beck *et al.*, 1995). En esta dirección son diferentes los estudios que han relacionado el crecimiento axonal con este factor de crecimiento. En cultivos de neuronales de neuronas obtenidas del hipocampo o de la corteza cerebral de ratones KO para el receptor de IGF1R se observó una reducción en el crecimiento axonal (Jin *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha comprobado que la sobreexpresión de IGF1 promueve el proceso de regeneración axonal tanto en retina como en médula espinal (Bei *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

A lo largo de esta tesis doctoral se ha demostrado que la activación del crecimiento neuronal por la actividad sináptica va acompañado por un incremento en el metabolismo de la glucosa. De acuerdo con este resultado, el tratamiento con BDNF, un factor de crecimiento caracterizado por estimular el crecimiento dendrítico (Cohen and Greenberg, 2008), también activa el metabolismo de la glucosa. De acuerdo con estos resultados, el factor de crecimiento IGF1 también estimula levemente el metabolismo glucolítico. Estudios previos han relacionado IGF1 con la activación del metabolismo glucolítico. IGF1 es capaz de incrementar la captación de glucosa activando la traslocación de Glut4 (Cheng *et al.*, 2000). Por otro lado, el tratamiento de líneas tumorales con este factor de crecimiento incrementa los niveles del factor de transcripción HIF-1 α y, en consecuencia, de Glut1 y HK2 (Salani *et al.*, 2015). Estos cambios a nivel de proteína se traducen en un incremento en el consumo y en la actividad glucolítica.

El leve incremento en el metabolismo de la glucosa promovido por el tratamiento con IGF1 podría ser debido a una reducida expresión del receptor de este factor de crecimiento en los cultivos primarios de neuronas corticales utilizados. En un estudio previo se demostró que en los cultivos primarios de neuronas los niveles de IGF1R incrementan con el tiempo (Costantini *et al.*, 2010). Sin embargo, en este mismo estudio se muestra que este incremento depende de diferentes factores liberados al medio por los astrocitos, de forma que, tras inhibir el crecimiento de estas células con el análogo de nucleótido AraC, este incremento no tiene lugar y los niveles del receptor son muy reducidos. Dado que los cultivos neuronales utilizados en esta tesis doctoral son generalmente tratados con AraC para reducir la proporción de células gliales, es posible que los niveles de expresión del IGF1R sean demasiado reducidos como para inducir un cambio mayor en el metabolismo celular.

El reducido cambio en el metabolismo neuronal tras cultivar las células en presencia del IGF1 lleva a considerar la posibilidad de que IGF1 requiera la colaboración con otros elementos, como BDNF, para promover esta vía y, en consecuencia, el crecimiento dendrítico. Al igual que BDNF (Cohen and Greenberg, 2008), cuya estimulación por la actividad sináptica depende del factor de

transcripción CREB, la inhibición de este factor mediante un dominante negativo ha demostrado que la actividad sináptica también promueve la transcripción de IGF1. Se ha comprobado que el tratamiento de cultivos de neuronas de hipocampo con BDNF o con IGF1 puede tener un efecto diferente en la regulación de diferentes vías de señalización. Mientras que IGF1 activa la vía de PI3K/Akt de forma rápida y sostenida en el tiempo y la vía de Shc/MAPK de forma transitoria, BDNF tiene el efecto contrario (Zheng and Quirion, 2004). Estas observaciones sugieren que ambos factores de crecimiento podrían activar vías diferentes necesarias para promover el crecimiento neuronal.

9.4 La actividad sináptica y el transporte mitocondrial en el axón.

Las mitocondrias son esenciales para la transmisión del impulso nervioso, puesto que son necesarias tanto para la generación de energía en forma de ATP, como para la regulación de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático (Cai, Davis and Sheng, 2011; Marland *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2018). A pesar de la activación del metabolismo de la glucosa descrita en los apartados anteriores, el transporte mitocondrial a lo largo del axón depende de la cadena de transporte de electrones, a diferencia del transporte de vesículas que depende de la glucólisis (Zala *et al.*, 2013). Dado que tanto el proceso de generación de nuevas mitocondrias como su mantenimiento o su degradación, conocida como mitofagia, tiene lugar principalmente en el soma los mecanismos de transporte de estos orgánulos a través del axón serán también de vital importancia para el desarrollo y la viabilidad neuronal. Diferentes enfermedades neurodegenerativas han sido directamente relacionadas con problemas con algún elemento relacionado con el transporte mitocondrial (Sheng and Cai, 2012).

HIF-1 α ha sido ampliamente relacionado con la regulación de la función mitocondrial (Papandreou *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2007; Formentini *et al.*, 2014). En condiciones de hipoxia, HIF-1 α puede regular el transporte de mitocondrias a lo largo del axón de neuronas corticales estimulando la expresión de la proteína MGARP, que promueve el transporte anterógrado interaccionando con Miro (Y. Li *et al.*, 2009). En esta tesis se ha comprobado que la actividad sináptica estimula el transporte anterógrado de mitocondrias a lo largo del axón mediante un mecanismo dependiente de HIF-1 α . Por otro lado, se ha demostrado que la actividad sináptica estimula la expresión de MGARP. Sin embargo, este efecto no parece estar regulado por HIF-1 α . A pesar de este resultado negativo, no es posible descartar que MGARP juegue un papel clave en el metabolismo o en el transporte mitocondrial en neuronas estimuladas. Esta proteína podría estar implicada también en otros procesos relacionados con el metabolismo neuronal. Previamente, ha

sido descrito que MGARP juega un papel clave en el transporte de colesterol hasta la mitocondria. Las líneas celulares con una mayor expresión de esta proteína presentan niveles mayores de colesterol en la OMM (Jinn *et al.*, 2015; Baba *et al.*, 2018).

Con todo esto sería interesante seguir evaluando el papel de MGARP en el desarrollo neuronal. Por un lado, sería interesante confirmar si MGARP podría estar implicado en la regulación del transporte mitocondrial mediante una vía independiente de HIF-1 α . Por otro sería interesante evaluar su posible papel en el crecimiento dendrítico axonal, a través del transporte de mitocondrias o mediante la regulación en el metabolismo del colesterol, esencial para la formación y funcionamiento de las membranas celulares. Otra línea de investigación posible sería analizar otros mecanismos por los que HIF-1 α podría estar regulando el transporte mitocondrial.

9.5 La actividad sináptica y los peroxisomas.

Los peroxisomas juegan un papel clave en el desarrollo y funcionamiento del CNS. Mutaciones en determinadas proteínas de peroxisomas como las citadas anteriormente, PEX5 y PEX13 causan el denominado síndrome de Zellweger. Los peroxisomas de las personas afectadas por este síndrome están vacíos, dado que la maquinaria encargada de la translocación de proteínas en estos orgánulos no funciona correctamente y por lo tanto no ejercen función alguna. Este síndrome se caracteriza a nivel fenotípico por la aparición de malformaciones en la corteza cerebral, causadas por problemas en la migración celular (Berger *et al.*, 2016).

Los peroxisomas juegan un papel clave tanto en el catabolismo como en el anabolismo lipídico (Islinger *et al.*, 2018). En esta tesis se ha comprobado que la actividad sináptica estimula la expresión de algunos genes implicados en el metabolismo de los mismos. ACOT8 es una acil-CoA tioesterasa implicada en la oxidación de acil-CoA de cadena larga mientras que ABCD2 es un transportador de acil-CoA ubicado en la membrana del peroxisoma (Geillon *et al.*, 2017; Tillander, Alexson and Cohen, 2017). La sobreexpresión de ACOT8 en líneas celulares promueve la generación de nuevos peroxisomas, junto con la acumulación de lípidos (Ishizuka *et al.*, 2004). Esta acumulación podría ser debida a una inhibición de la β -oxidación de lípidos como consecuencia de la actividad de ACOT8 (Hunt, Siponen and Alexson, 2012). Se ha comprobado que ACOT8 juega un papel esencial en el crecimiento de diferentes tumores, puesto que su inhibición reduce el crecimiento del carcinoma hepatocelular (Hung *et al.*, 2014). ABCD2 es esencial para el transporte de ácidos grasos de cadena muy larga. Una reducción en los niveles de colesterol disponible incrementa su expresión (Weinhofer, 2002), lo que podría indicar que los

ácidos grasos de cadena muy larga son metabolizados en el peroxisoma con el objetivo de obtener los metabolitos precursores para la síntesis del colesterol como el acetil-CoA o el malonil-CoA. Por lo tanto, la actividad sináptica podría estar regulando el metabolismo lipídico de los peroxisomas con el objetivo de sintetizar determinados lípidos utilizados en la generación de nuevas membranas a partir de lípidos de cadena larga preexistentes.

En el presente estudio se ha observado un incremento en la expresión de las peroxinas PEX5, PEX13 y PEX11a, esenciales para el crecimiento y el mantenimiento de los peroxisomas. PEX5 y PEX13 están implicadas en el transporte de proteínas hasta el peroxisoma. PEX5 es la proteína encargada de mediar el transporte de las proteínas con la señal de localización en el peroxisoma PTS1 desde el citoplasma, donde son sintetizadas, hasta el peroxisoma. PEX13, en cambio, forma parte del complejo integrado en la membrana de los peroxisomas con el que PEX5 interacciona para facilitar la traslocación de la proteína transportada hasta la matriz del peroxisoma (Smith and Aitchison, 2013). Por otro lado, PEX11a regula la elongación y proliferación de los peroxisomas. Su delección en ratones causa una reducción en el número total de peroxisomas y hace que estos tengan una forma más redondeada (Weng *et al.*, 2013). A pesar de que los datos expuestos son muy preliminares es posible decir que la actividad sináptica está de algún modo, implicada en la regulación del crecimiento de los peroxisomas, que podrían jugar un papel clave en la síntesis de diferentes lípidos necesarios para el crecimiento neuronal. En un futuro sería interesante confirmar esta observación comparando el número, la morfología y la disposición de los peroxisomas en neuronas en reposo y estimuladas sinápticamente, así como evaluar posibles cambios en los niveles de los lípidos cuya síntesis depende de estos orgánulos, como es el caso de los lípidos éter.

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos han llevado a las siguientes conclusiones:

- 1. La glucosa es necesaria para el correcto desarrollo tanto del árbol dendrítico como del axón en neuronas corticales.**
- 2. La actividad sináptica estimula la incorporación de glucosa en lípidos y la síntesis del precursor de los ácidos grasos acetil-CoA.**
- 3. La actividad sináptica estimula la captación de glucosa y la glucólisis en neuronas corticales induciendo la transcripción de los genes que codifican el principal transportador de la glucosa, Glut3, las enzimas limitantes de la glucólisis, HK2 y PKM1/2, y la enzima que cataliza la síntesis del principal activador de PFK1, PFKFB3.**
- 4. La actividad sináptica estimula la expresión de las enzimas implicadas en regulación de la glucólisis mediante la activación de HIF-1 α .**
- 5. La actividad sináptica promueve la estabilización del factor de transcripción HIF-1 α mediante un mecanismo que depende de Siah2.**
- 6. La actividad sináptica estimula la transcripción del transportador de glucosa Glut3 y de la ubiquitina ligasa Sah2 mediante la activación del factor de transcripción CREB.**
- 7. HIF-1 α es necesario para asegurar el correcto crecimiento neurítico tanto en neuronas *in vitro* como *in vivo*.**
- 8. La actividad sináptica estimula la expresión de diferentes genes implicados con el metabolismo y crecimiento de los peroxisomas.**
- 9. La actividad sináptica regula el transporte anterógrado de mitocondrias a lo largo del axón mediante un mecanismo regulado por el factor de transcripción HIF-1 α .**
- 10. La actividad sináptica estimula la expresión de IGF1 mediante el factor de transcripción CREB.**

11. BIBLIOGRAFÍA

Abe, Y. *et al.* (2018) 'Peroxisome biogenesis deficiency attenuates the BDNF-TrkB pathway-mediated development of the cerebellum', *Life Science Alliance*. Life Science Alliance, 1(6), p. e201800062. doi: 10.26508/lsa.201800062.

Abramoff, M. D., Magalhães, P. J. and Ram, S. J. (2004) 'Image processing with ImageJ', *Biophotonics international*. <http://www.photonics.com/>, pp. 36–42.

Agostini, M. *et al.* (2016) 'Metabolic reprogramming during neuronal differentiation', *Cell Death and Differentiation*, 23(9), pp. 1502–1514. doi: 10.1038/cdd.2016.36.

Ahn, S. *et al.* (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*. American Society for Microbiology Journals, 18(2), pp. 967–77. doi: 10.1128/mcb.18.2.967.

Alam, T. *et al.* (2016) 'Axotomy-induced HIF-serotonin signalling axis promotes axon regeneration in *C. elegans*', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 10388. doi: 10.1038/ncomms10388.

Altarejos, J. Y. and Montminy, M. (2011) 'CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 12(3), pp. 141–151. doi: 10.1038/nrm3072.

Andreae, L. C. and Burrone, J. (2014) 'The role of neuronal activity and transmitter release on synapse formation', *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Current Trends, pp. 47–52. doi: 10.1016/j.conb.2014.02.008.

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.

Arikkath, J. (2012) 'Molecular mechanisms of dendrite morphogenesis', *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers, p. 61. doi: 10.3389/fncel.2012.00061.

Arimura, N. and Kaibuchi, K. (2007) 'Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 8(3), pp. 194–205. doi: 10.1038/nrn2056.

Arnold, G. and Holtzman, E. (1978) 'Microperoxisomes in the central nervous system of the postnatal rat', *Brain Research*. Elsevier, 155(1), pp. 1–17. doi: 10.1016/0006-8993(78)90300-1.

Arnold, S. E. *et al.* (2018) 'Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: Concepts and conundrums', *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group, pp. 168–181. doi: 10.1038/nrneurol.2017.185.

Arora, K. K. and Pedersen, P. L. (1988) 'Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP.', *The Journal of biological chemistry*, 263(33), pp. 17422–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3182854> (Accessed: 28 May 2019).

Ashrafi, G. and Ryan, T. A. (2017) 'Glucose metabolism in nerve terminals', *Current Opinion in Neurobiology*, pp. 156–161. doi: 10.1016/j.conb.2017.03.007.

Baba, T. *et al.* (2018) 'Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids.', *Communications biology*. Nature Publishing Group, 1, p. 18. doi: 10.1038/s42003-018-0020-z.

Bading, H. (2013) 'Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 14(9), pp. 593–608. doi: 10.1038/nrn3531.

Baenke, F. *et al.* (2013) 'Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development.', *Disease models & mechanisms*. The Company of Biologists Ltd, 6(6), pp. 1353–63. doi: 10.1242/dmm.011338.

Barstow, K. L. *et al.* (2004) 'The modulation of action potential generation by calcium-induced calcium release is enhanced by mitochondrial inhibitors in mudpuppy parasympathetic neurons', *Neuroscience*. Pergamon, 124(2), pp. 327–339. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.12.010.

Bartrons, R. *et al.* (1983) 'Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes.', *The Biochemical journal*. Portland Press Ltd, 214(3), pp. 829–37. doi: 10.1042/bj2140829.

Bartrup, J. T., Moorman, J. M. and Newberry, N. R. (1997) 'BDNF enhances neuronal growth and synaptic activity in hippocampal cell cultures', *NeuroReport*, 8(17), pp. 3791–3794. doi: 10.1097/00001756-199712010-00027.

Bas-Orth, C. *et al.* (2017) 'Synaptic Activity Drives a Genomic Program That Promotes a Neuronal Warburg Effect.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 292(13), pp. 5183–5194. doi: 10.1074/jbc.M116.761106.

Beck, K. D. *et al.* (1995) 'Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons', *Neuron*, 14(4), pp. 717–730. doi: 10.1016/0896-6273(95)90216-3.

Bei, F. *et al.* (2016) 'Restoration of Visual Function by Enhancing Conduction in Regenerated Axons', *Cell*. Elsevier, 164(1–2), pp. 219–232. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.036.

Bélangier, M., Allaman, I. and Magistretti, P. J. (2011) 'Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation.', *Cell metabolism*. Elsevier, 14(6), pp. 724–38. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.016.

Ben-Zvi, A. *et al.* (2014) 'Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier', *Nature*. Nature Publishing Group, 509(7501), pp. 507–511. doi: 10.1038/nature13324.

Bensaad, K. *et al.* (2014) 'Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation.', *Cell reports*. Elsevier, 9(1), pp. 349–365. doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.056.

Berger, J. *et al.* (1999) 'The four murine peroxisomal ABC-transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression', *European Journal of Biochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 265(2), pp. 719–727. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00772.x.

Berger, J. *et al.* (2016) 'Peroxisomes in brain development and function', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1863(5), pp. 934–955. doi: 10.1016/J.BBAMCR.2015.12.005.

Bird, A. D. and Cuntz, H. (2019) 'Dissecting Sholl Analysis into Its Functional Components', *Cell Reports*, 27(10), pp. 3081-3096.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.097.

Birsa, N. *et al.* (2013) 'Mitochondrial trafficking in neurons and the role of the Miro family of GTPase proteins', in *Biochemical Society Transactions*. Portland Press Limited, pp. 1525–1531. doi: 10.1042/BST20130234.

Bishop, K. M., Rubenstein, J. L. R. and O'Leary, D. D. M. (2002) 'Distinct actions of Emx1, Emx2, and Pax6 in regulating the specification of areas in the developing neocortex.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 22(17), pp. 7627–38. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-17-07627.2002.

Bittar, P. G. *et al.* (1996) 'Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 16(6), pp. 1079–1089. doi: 10.1097/00004647-199611000-00001.

Blazey, T., Snyder, Abraham Z., *et al.* (2018) 'A systematic meta-analysis of oxygen-to-glucose and oxygen-to-carbohydrate ratios in the resting human brain', *PLoS ONE*. Edited by P.-N. Wang. Public Library of Science, 13(9), p. e0204242. doi: 10.1371/journal.pone.0204242.

Blazey, T., Snyder, Abraham Z., *et al.* (2018) 'Quantitative positron emission tomography reveals regional differences in aerobic glycolysis within the human brain', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23 March, p. 0271678X1876700. doi:

10.1177/0271678X18767005.

Bolaños, J. P. and Almeida, A. (2010) 'The pentose-phosphate pathway in neuronal survival against nitrosative stress', *IUBMB Life*, pp. 14–18. doi: 10.1002/iub.280.

Borges, S. and Berry, M. (1978) 'The effects of dark rearing on the development of the visual cortex of the rat', *Journal of Comparative Neurology*. John Wiley & Sons, Ltd, 180(2), pp. 277–300. doi: 10.1002/cne.901800207.

Boström, P. *et al.* (2006) 'Hypoxia converts human macrophages into triglyceride-loaded foam cells.', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Lippincott Williams & Wilkins, 26(8), pp. 1871–6. doi: 10.1161/01.ATV.0000229665.78997.0b.

Brown, F. R. *et al.* (1982) 'Cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome and neonatal adrenoleukodystrophy: similarities in phenotype and accumulation of very long chain fatty acids.', *The Johns Hopkins medical journal*, 151(6), pp. 344–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7176294> (Accessed: 1 September 2019).

Bryson, J. M. *et al.* (2002) 'Increased hexokinase activity, of either ectopic or endogenous origin, protects renal epithelial cells against acute oxidant-induced cell death', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 277(13), pp. 11392–11400. doi: 10.1074/jbc.M110927200.

Bullen, J. W. *et al.* (2016) 'Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1.', *Science signaling*. American Association for the Advancement of Science, 9(430), p. ra56. doi: 10.1126/scisignal.aaf0583.

Burns, J. S. and Manda, G. (2017) 'Metabolic pathways of the Warburg effect in health and disease: Perspectives of choice, chain or chance', *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). doi: 10.3390/ijms18122755.

Busquets, O. *et al.* (2018) 'JNK1 inhibition by Licochalcone A leads to neuronal protection against excitotoxic insults derived of kainic acid', *Neuropharmacology*. Pergamon, 131, pp. 440–452. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.10.030.

Butterfield, D. A. and Halliwell, B. (2019) 'Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 148–160. doi: 10.1038/s41583-019-0132-6.

Cacchiarelli, D. *et al.* (2015) 'Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency.', *Cell*. Elsevier, 162(2), pp. 412–424. doi: 10.1016/j.cell.2015.06.016.

Cai, Q., Davis, M. L. and Sheng, Z. H. (2011) 'Regulation of axonal mitochondrial transport and its impact on synaptic transmission', *Neuroscience Research*. Elsevier, pp. 9–15. doi: 10.1016/j.neures.2011.02.005.

Calmettes, G. *et al.* (2013) 'Hexokinase–mitochondrial interactions regulate glucose metabolism differentially in adult and neonatal cardiac myocytes', *The Journal of General Physiology*. The Rockefeller University Press, 142(4), pp. 425–436. doi: 10.1085/jgp.201310968.

Camargo, N., Smit, A. B. and Verheijen, M. H. G. (2009) 'SREBPs: SREBP function in glia-neuron interactions', *FEBS Journal*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), pp. 628–636. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06808.x.

Campos-Bedolla, P. *et al.* (2014) 'Role of the Blood-Brain Barrier in the Nutrition of the Central Nervous System', *Archives of Medical Research*, pp. 610–638. doi: 10.1016/j.arcmed.2014.11.018.

Cao, J. *et al.* (2006) 'Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52), pp. 19695–19700. doi: 10.1073/pnas.0609140103.

Cavadas, M. A., Nguyen, L. K. and Cheong, A. (2013) 'Hypoxia-inducible factor (HIF) network: insights from mathematical models.', *Cell communication and signaling : CCS*. BioMed Central, 11(1), p. 42. doi: 10.1186/1478-811X-11-42.

Cazzin, C. *et al.* (2011) 'Microarray analysis of cultured rat hippocampal neurons treated with brain derived neurotrophic factor', *Molecular Biology Reports*. Springer Netherlands, 38(2), pp. 983–990. doi: 10.1007/s11033-010-0193-0.

Chae, Y. C. *et al.* (2016) 'Mitochondrial Akt Regulation of Hypoxic Tumor Reprogramming', *Cancer Cell*, 30(2), pp. 257–272. doi: 10.1016/j.ccell.2016.07.004.

Chamboredon, S. *et al.* (2011) 'Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA: a new target for destabilization by tristetraproline in endothelial cells', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by M. P. Wickens, 22(18), pp. 3366–3378. doi: 10.1091/mbc.e10-07-0617.

Chaneton, B. *et al.* (2012) 'Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2', *Nature*. Nature Publishing Group, 491(7424), pp. 458–462. doi: 10.1038/nature11540.

Chen, C. *et al.* (2001) 'Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 276(12), pp. 9519–25. doi: 10.1074/jbc.M010144200.

Chen, Y. and Sheng, Z. H. (2013) 'Kinesin-1-syntrophin coupling mediates activity-

dependent regulation of axonal mitochondrial transport', *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press, 202(2), pp. 351–364. doi: 10.1083/jcb.201302040.

Cheng, C. M. *et al.* (2000) 'Insulin-like growth factor 1 regulates developing brain glucose metabolism.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 97(18), pp. 10236–41. doi: 10.1073/pnas.170008497.

Cheng, P.-L. *et al.* (2011) 'Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 95(16), pp. 18430–18435. doi: 10.1073/pnas.95.16.9614.

Chevaleyre, V., Moos, F. C. and Desarménien, M. G. (2002) 'Interplay between presynaptic and postsynaptic activities is required for dendritic plasticity and synaptogenesis in the supraoptic nucleus.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 22(1), pp. 265–73. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-01-00265.2002.

Cho, Y. *et al.* (2015) 'Activating Injury-Responsive Genes with Hypoxia Enhances Axon Regeneration through Neuronal HIF-1 α ', *Neuron*. Elsevier, 88(4), pp. 720–734. doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.050.

Choi, S. M. *et al.* (2008) 'Stra13/DEC1 and DEC2 inhibit sterol regulatory element binding protein-1c in a hypoxia-inducible factor-dependent mechanism', *Nucleic Acids Research*. Narnia, 36(20), pp. 6372–6385. doi: 10.1093/nar/gkn620.

Choquet, D. and Triller, A. (2013) 'The dynamic synapse', *Neuron*. Elsevier, pp. 691–703. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.013.

Christofk, H. R. *et al.* (2008) 'The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth', *Nature*, 452(7184), pp. 230–233. doi: 10.1038/nature06734.

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.

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.

Costantini, C. *et al.* (2010) 'Astrocytes regulate the expression of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1-R) in primary cortical neurons during in vitro senescence', *Journal of Molecular Neuroscience*. Humana Press Inc, 40(3), pp. 342–352. doi: 10.1007/s12031-009-9305-5.

Daneman, R. and Prat, A. (2015) 'The blood-brain barrier.', *Cold Spring Harbor perspectives*

in biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 7(1), p. a020412. doi: 10.1101/cshperspect.a020412.

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.

van Deijk, A. L. F. *et al.* (2017) 'Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function in vivo', *GLIA*. John Wiley & Sons, Ltd, 65(4), pp. 670–682. doi: 10.1002/glia.23120.

Denko, N. C. (2008) 'Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, pp. 705–713. doi: 10.1038/nrc2468.

Denton, R. M. (2009) 'Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier, pp. 1309–1316. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.01.005.

Denton, R. M., Randle, P. J. and Martin, B. R. (1972) 'Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase.', *The Biochemical journal*. Portland Press Ltd, 128(1), pp. 161–163. doi: 10.1042/bj1280161.

Díaz-García, C. M. *et al.* (2017) 'Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake', *Cell Metabolism*, 26(2), pp. 361–374.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2017.06.021.

Díaz-García, C. M. and Yellen, G. (2018) 'Neurons rely on glucose rather than astrocytic lactate during stimulation', *Journal of Neuroscience Research*. John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/jnr.24374.

Dienel, G. A. (2017) 'Lack of appropriate stoichiometry: Strong evidence against an energetically important astrocyte–neuron lactate shuttle in brain', *Journal of Neuroscience Research*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 2103–2125. doi: 10.1002/jnr.24015.

Dienel, G. A. and Cruz, N. F. (2016) 'Aerobic glycolysis during brain activation: adrenergic regulation and influence of norepinephrine on astrocytic metabolism', *Journal of Neurochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), pp. 14–52. doi: 10.1111/jnc.13630.

Divakaruni, A. S. *et al.* (2017) 'Inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier protects from excitotoxic neuronal death.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 216(4), pp. 1091–1105. doi: 10.1083/jcb.201612067.

Dotti, C. G., Sullivan, C. A. and Banker, G. A. (1988) 'The establishment of polarity by

hippocampal neurons in culture.’, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 8(4), pp. 1454–68. doi: 10.1523/JNEUROSCI.08-04-01454.1988.

Draoui, N., de Zeeuw, P. and Carmeliet, P. (2017) ‘Angiogenesis revisited from a metabolic perspective: role and therapeutic implications of endothelial cell metabolism.’, *Open biology*. The Royal Society, 7(12). doi: 10.1098/rsob.170219.

Du, J. *et al.* (2000) ‘Activity- and Ca²⁺-Dependent Modulation of Surface Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Receptors in Hippocampal Neurons’, *The Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 150(6), p. 1423. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2150695/> (Accessed: 18 July 2019).

Duran, J. *et al.* (2019) ‘Lack of Neuronal Glycogen Impairs Memory Formation and Learning-Dependent Synaptic Plasticity in Mice’, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers, 13, p. 374. doi: 10.3389/fncel.2019.00374.

Edison, P. *et al.* (2013) ‘Microglia, amyloid, and glucose metabolism in Parkinson’s disease with and without dementia.’, *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 38(6), pp. 938–49. doi: 10.1038/npp.2012.255.

el-Maghrabi, M. R. *et al.* (1982) ‘Regulation of 6-phosphofructo-2-kinase activity by cyclic AMP-dependent phosphorylation.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 79(2), pp. 315–9. doi: 10.1073/pnas.79.2.315.

Emerling, B. M. *et al.* (2008) ‘PTEN regulates p300-dependent hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity through Forkhead transcription factor 3a (FOXO3a)’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), pp. 2622–2627. doi: 10.1073/pnas.0706790105.

Espinosa, J. S. *et al.* (2009) ‘Uncoupling Dendrite Growth and Patterning: Single-Cell Knockout Analysis of NMDA Receptor 2B’, *Neuron*. Elsevier, 62(2), pp. 205–217. doi: 10.1016/j.neuron.2009.03.006.

Ferreira, J. M., Burnett, A. L. and Rameau, G. A. (2011) ‘Activity-dependent regulation of surface glucose transporter-3.’, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 31(6), pp. 1991–9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1850-09.2011.

Firth, J. D., Ebert, B. L. and Ratcliffe, P. J. (1995) ‘Hypoxic Regulation of Lactate

Dehydrogenase A', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 270(36), pp. 21021–21027. doi: 10.1074/jbc.270.36.21021.

FOLCH, J., LEES, M. and SLOANE STANLEY, G. H. (1957) 'A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.', *The Journal of biological chemistry*, 226(1), pp. 497–509. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13428781> (Accessed: 25 July 2019).

Formentini, L. *et al.* (2014) 'In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning', *The EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 33(7), pp. 762–778. doi: 10.1002/embj.201386392.

Fox, P. T. *et al.* (1988) 'Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity.', *Science (New York, N.Y.)*, 241(4864), pp. 462–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3260686> (Accessed: 13 June 2019).

Frauwirth, K. A. *et al.* (2002) 'The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism', *Immunity*. Cell Press, 16(6), pp. 769–777. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00323-0.

Frew, I. J. *et al.* (2003) 'Generation and analysis of Siah2 mutant mice.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology Journals, 23(24), pp. 9150–61. doi: 10.1128/mcb.23.24.9150-9161.2003.

Fukuda, R. *et al.* (2007) 'HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells', *Cell*. Elsevier, 129(1), pp. 111–122. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.047.

Funfschilling, U. *et al.* (2012) 'Critical Time Window of Neuronal Cholesterol Synthesis during Neurite Outgrowth', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 32(22), pp. 7632–7645. doi: 10.1523/jneurosci.1352-11.2012.

Furuta, E. *et al.* (2008) 'Fatty Acid Synthase Gene Is Up-regulated by Hypoxia via Activation of Akt and Sterol Regulatory Element Binding Protein-1', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 68(4), pp. 1003–1011. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2489.

Futerman, A. H. and Banker, G. A. (1996) 'The economics of neurite outgrowth - The addition of new membrane to growing axons', *Trends in Neurosciences*. Elsevier Current Trends, pp. 144–149. doi: 10.1016/S0166-2236(96)80025-7.

Gage, G. J., Kipke, D. R. and Shain, W. (2012) 'Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents', *Journal of Visualized Experiments*, (65). doi: 10.3791/3564.

Gazit, N. *et al.* (2016) 'IGF-1 Receptor Differentially Regulates Spontaneous and Evoked

Transmission via Mitochondria at Hippocampal Synapses.’, *Neuron*. Elsevier, 89(3), pp. 583–97. doi: 10.1016/j.neuron.2015.12.034.

Geillon, F. *et al.* (2017) ‘Peroxisomal ATP-binding cassette transporters form mainly tetramers.’, *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 292(17), pp. 6965–6977. doi: 10.1074/jbc.M116.772806.

Giove, F. *et al.* (2003) ‘The physiology and metabolism of neuronal activation: in vivo studies by NMR and other methods.’, *Magnetic resonance imaging*, 21(10), pp. 1283–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14725935> (Accessed: 23 May 2019).

Goldberg, J. L. *et al.* (2002) ‘Retinal Ganglion Cells Do Not Extend Axons by Default: Promotion by Neurotrophic Signaling and Electrical Activity’, *Neuron*. Cell Press, 33(5), pp. 689–702. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00602-5.

Goldberg, J. L. (2003) ‘How does an axon grow?’, *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 941–958. doi: 10.1101/gad.1062303.

Gonzalez-Baró, M. R., Lewin, T. M. and Coleman, R. A. (2007) ‘Regulation of Triglyceride Metabolism II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action’, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(5), pp. G1195–G1199. doi: 10.1152/ajpgi.00553.2006.

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.

Govil-Dalela, T. *et al.* (2018) ‘Evolution of lobar abnormalities of cerebral glucose metabolism in 41 children with drug-resistant epilepsy’, *Epilepsia*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 59(7), pp. 1307–1315. doi: 10.1111/epi.14404.

Goyal, M. S. *et al.* (2014) ‘Aerobic glycolysis in the human brain is associated with development and neonatal gene expression’, *Cell Metabolism*, 19(1), pp. 49–57. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.020.

Goyal, M. S. *et al.* (2017) ‘Loss of Brain Aerobic Glycolysis in Normal Human Aging’, *Cell Metabolism*, 26(2), pp. 353-360.e3. doi: 10.1016/j.cmet.2017.07.010.

Goyal, M. S. and Raichle, M. E. (2018) ‘Glucose Requirements of the Developing Human Brain’, *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, pp. S46–S49. doi: 10.1097/MPG.0000000000001875.

Graham, A. M. and Presnell, J. S. (2017) ‘Hypoxia Inducible Factor (HIF) transcription factor

family expansion, diversification, divergence and selection in eukaryotes', *PLOS ONE*. Edited by S. Bertrand. Public Library of Science, 12(6), p. e0179545. doi: 10.1371/journal.pone.0179545.

Graham, F. L. *et al.* (1977) 'Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5', *Journal of General Virology*. Microbiology Society, 36(1), pp. 59–72. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59.

Greer, P. L. and Greenberg, M. E. (2008) 'From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function.', *Neuron*. Elsevier, 59(6), pp. 846–60. doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.002.

Groc, L. *et al.* (2002) 'In vivo blockade of neural activity alters dendritic development of neonatal CA1 pyramidal cells', *European Journal of Neuroscience*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 16(10), pp. 1931–1938. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02264.x.

Guo, X. *et al.* (2005) 'The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria in drosophila synapses', *Neuron*. Cell Press, 47(3), pp. 379–393. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.027.

Hakuno, F. and Takahashi, S. I. (2018) '40 years of IGF1: IGF1 receptor signaling pathways', *Journal of Molecular Endocrinology*, pp. T69–T86. doi: 10.1530/JME-17-0311.

Van Hall, G. *et al.* (2009) 'Blood lactate is an important energy source for the human brain', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. SAGE Publications Sage UK: London, England, 29(6), pp. 1121–1129. doi: 10.1038/jcbfm.2009.35.

Halliwell, B. (2006) 'Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now?', *Journal of Neurochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), pp. 1634–1658. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x.

Hamilton, J. A. *et al.* (2007) 'Brain uptake and utilization of fatty acids, lipids and lipoproteins: Application to neurological disorders', in *Journal of Molecular Neuroscience*. Humana Press Inc, pp. 2–11. doi: 10.1007/s12031-007-0060-1.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of Cancer: The Next Generation', *Cell*. Elsevier, 144(5), pp. 646–674. doi: 10.1016/J.CELL.2011.02.013.

Hardingham, G. E., Arnold, F. J. L. and Bading, H. (2001) 'Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 4(3), pp. 261–267. doi: 10.1038/85109.

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. doi: 10.1038/nrn2911.

Hardingham, G. E., Fukunaga, Y. and Bading, H. (2002) 'Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 5(5), pp. 405–414. doi: 10.1038/nn835.

Harris, J. J., Jolivet, R. and Attwell, D. (2012) 'Synaptic Energy Use and Supply', *Neuron*. Cell Press, 75(5), pp. 762–777. doi: 10.1016/J.NEURON.2012.08.019.

Hasel, P. *et al.* (2017) 'Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8(1), p. 15132. doi: 10.1038/ncomms15132.

Hatzivassiliou, G. *et al.* (2005) 'ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth.', *Cancer cell*. Elsevier, 8(4), pp. 311–21. doi: 10.1016/j.ccr.2005.09.008.

Hayashi, H. and Oohashi, M. (1995) 'Incorporation of acetyl-CoA generated from peroxisomal β -oxidation into ethanolamine plasmalogen of rat liver', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1254(3), pp. 319–325. doi: 10.1016/0005-2760(94)00194-4.

Heiden, M. G. Vander, Cantley, L. C. and Thompson, C. B. (2009) 'Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation', *Science*. NIH Public Access, pp. 1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809.

Helton, R. *et al.* (2005) 'Brain-Specific Knock-Out of Hypoxia-Inducible Factor-1 Reduces Rather Than Increases Hypoxic-Ischemic Damage', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 25(16), pp. 4099–4107. doi: 10.1523/jneurosci.4555-04.2005.

Herrero-Mendez, A. *et al.* (2009) 'The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1', *Nature Cell Biology*, 11(6), pp. 747–752. doi: 10.1038/ncb1881.

Hicks, K. C. and Patel, T. B. (2016) 'Sprouty2 Protein Regulates Hypoxia-inducible Factor- α (HIF α) Protein Levels and Transcription of HIF α -responsive Genes.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 291(32), pp. 16787–801. doi: 10.1074/jbc.M116.714139.

Hinckelmann, M.-V. *et al.* (2016) 'Self-propelling vesicles define glycolysis as the minimal energy machinery for neuronal transport', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 13233. doi: 10.1038/ncomms13233.

Hitosugi, T. *et al.* (2009) 'Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the warburg effect and tumor growth', *Science Signaling*. American Association for the Advancement of Science, 2(97), p. ra73. doi: 10.1126/scisignal.2000431.

Holtmaat, A. J. G. D. *et al.* (2005) 'Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo', *Neuron*. Cell Press, 45(2), pp. 279–291. doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.003.

Houdou, S. *et al.* (1991) 'Developmental immunohistochemistry of catalase in the human brain', *Brain Research*. Elsevier, 556(2), pp. 267–270. doi: 10.1016/0006-8993(91)90314-L.

Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2002) 'Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function', *Annual Review of Neuroscience*. NIH Public Access, 24(1), pp. 677–736. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.677.

Huang, L. E. *et al.* (1998) 'Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 95(14), pp. 7987–7992. doi: 10.1073/pnas.95.14.7987.

Huang, Y. *et al.* (2012) 'Normal glucose uptake in the brain and heart requires an endothelial cell-specific HIF-1 -dependent function', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 109(43), pp. 17478–17483. doi: 10.1073/pnas.1209281109.

Hui, S. *et al.* (2017) 'Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate.', *Nature*. Nature Publishing Group, 551(7678), pp. 115–118. doi: 10.1038/nature24057.

Hung, Y. U. H. *et al.* (2014) 'Fatty acid metabolic enzyme acyl-CoA thioesterase 8 promotes the development of hepatocellular carcinoma', *Oncology Reports*. Spandidos Publications, 31(6), pp. 2797–2803. doi: 10.3892/or.2014.3155.

Hunt, M. C., Siponen, M. I. and Alexson, S. E. H. (2012) 'The emerging role of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases in regulating peroxisomal lipid metabolism', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Elsevier, 1822(9), pp. 1397–1410. doi: 10.1016/J.BBADIS.2012.03.009.

Hutto, R. A. *et al.* (2019) 'Increasing Ca²⁺ in photoreceptor mitochondria alters metabolites, accelerates photoresponse recovery, and reveals adaptations to mitochondrial stress', *Cell Death & Differentiation*. Nature Publishing Group, pp. 1–19. doi: 10.1038/s41418-019-0398-2.

HUYGHE, S. *et al.* (2001) 'Prenatal and postnatal development of peroxisomal lipid-metabolizing pathways in the mouse', *Biochemical Journal*. Portland Press Limited, 353(3), pp. 673–680. doi: 10.1042/BJ3530673.

Ichikawa, M. *et al.* (1993) 'Formation and maturation of synapses in primary cultures of rat cerebral cortical cells: an electron microscopic study', *Neuroscience Research*. Elsevier, 16(2), pp. 95–103. doi: 10.1016/0168-0102(93)90076-3.

Impey, S. *et al.* (1998) 'Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation', *Neuron*. Cell Press, 21(4), pp. 869–883. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80602-9.

Iommarini, L. *et al.* (2017) 'Non-Canonical Mechanisms Regulating Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha in Cancer.', *Frontiers in oncology*. Frontiers Media SA, 7, p. 286. doi: 10.3389/fonc.2017.00286.

Ishikawa, T. *et al.* (2001) 'Peroxisomes exist in growth cones and move anterogradely and retrogradely in neurites of PC12D cells', *Experimental Cell Research*. Academic Press, 266(2), pp. 260–269. doi: 10.1006/excr.2001.5226.

Ishizuka, M. *et al.* (2004) 'Overexpression of human acyl-CoA thioesterase upregulates peroxisome biogenesis', *Experimental Cell Research*. Academic Press, 297(1), pp. 127–141. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.02.029.

Islinger, M. *et al.* (2018) 'The peroxisome: an update on mysteries 2.0', *Histochemistry and Cell Biology*. Springer Berlin Heidelberg, 150(5), pp. 443–471. doi: 10.1007/s00418-018-1722-5.

Ivan, M. *et al.* (2001) 'HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 292(5516), pp. 464–8. doi: 10.1126/science.1059817.

Iwabuchi, S. and Kawahara, K. (2011) 'Inducible astrocytic glucose transporter-3 contributes to the enhanced storage of intracellular glycogen during reperfusion after ischemia', *Neurochemistry International*, 59(2), pp. 319–325. doi: 10.1016/j.neuint.2011.06.006.

Iyer, N. V. *et al.* (1998) 'Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α ', *Genes & Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 12(2), p. 149. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316445/> (Accessed: 2 July 2019).

Jaakkola, P. *et al.* (2001) 'Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 292(5516), pp. 468–472. doi: 10.1126/science.1059796.

Jang, S. *et al.* (2016) 'Glycolytic Enzymes Localize to Synapses under Energy Stress to Support Synaptic Function.', *Neuron*. Elsevier, 90(2), pp. 278–91. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.011.

Jauch-Chara, K. and Oltmanns, K. M. (2014) 'Glycemic control after brain injury: Boon and bane for the brain', *Neuroscience*, pp. 202–209. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.059.

Jin, J. *et al.* (2019) 'Igf1R/InsR function is required for axon extension and corpus callosum formation', *PLOS ONE*. Edited by M. Sato. Public Library of Science, 14(7), p. e0219362. doi: 10.1371/journal.pone.0219362.

Jin, N. *et al.* (2013) 'CREB regulates the expression of neuronal glucose transporter 3: a possible mechanism related to impaired brain glucose uptake in Alzheimer's disease', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 41(5), p. 3240. doi: 10.1093/NAR/GKS1227.

Jinn, S. *et al.* (2015) 'snoRNA U17 regulates cellular cholesterol trafficking.', *Cell metabolism*. Elsevier, 21(6), pp. 855–67. doi: 10.1016/j.cmet.2015.04.010.

Jung, S.-Y. *et al.* (2012) 'Reduced expression of FASN through SREBP-1 down-regulation is responsible for hypoxic cell death in HepG2 cells', *Journal of Cellular Biochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, 113(12), pp. 3730–3739. doi: 10.1002/jcb.24247.

Jurica, M. S. *et al.* (1998) 'The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate', *Structure*. Elsevier, 6(2), pp. 195–210. doi: 10.1016/S0969-2126(98)00021-5.

Kaduce, T. L. *et al.* (2008) 'Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 fatty acid precursors in rat hippocampal neurons', *Journal of Neurochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 105(4), pp. 1525–1535. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05274.x.

Kalb, R. G. (1994) 'Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation.', *Development (Cambridge, England)*, 120(11), pp. 3063–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7720552> (Accessed: 14 July 2019).

Kelly, B. and O'Neill, L. A. (2015) 'Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity', *Cell Research*. Nature Publishing Group, pp. 771–784. doi: 10.1038/cr.2015.68.

Kerschensteiner, D. *et al.* (2009) 'Neurotransmission selectively regulates synapse formation in parallel circuits in vivo', *Nature*. Nature Publishing Group, 460(7258), pp. 1016–1020. doi: 10.1038/nature08236.

Khacho, M. and Slack, R. S. (2018) 'Mitochondrial dynamics in the regulation of neurogenesis: From development to the adult brain', *Developmental Dynamics*. John Wiley & Sons, Ltd, 247(1), pp. 47–53. doi: 10.1002/dvdy.24538.

Kim, J. W. *et al.* (2006) 'HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia', *Cell Metabolism*. Elsevier, 3(3), pp. 177–185. doi: 10.1016/j.cmet.2006.02.002.

Kluza, J. *et al.* (2012) 'Inactivation of the HIF-1 /PDK3 Signaling Axis Drives Melanoma

toward Mitochondrial Oxidative Metabolism and Potentiates the Therapeutic Activity of Pro-Oxidants', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 72(19), pp. 5035–5047. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0979.

Knobloch, M. *et al.* (2013) 'Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis.', *Nature*. Nature Publishing Group, 493(7431), pp. 226–30. doi: 10.1038/nature11689.

Knoll, A. *et al.* (1999) 'Gene expression of peroxisomal β -oxidation enzymes in rat brain', *Molecular Brain Research*. Elsevier, 74(1–2), pp. 217–220. doi: 10.1016/S0169-328X(99)00252-1.

Kolobova, E. *et al.* (2001) 'Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites.', *The Biochemical journal*. Portland Press Limited, 358(Pt 1), pp. 69–77. doi: 10.1042/0264-6021:3580069.

Kong, D. *et al.* (2005) 'Echinomycin, a Small-Molecule Inhibitor of Hypoxia-Inducible Factor-1 DNA-Binding Activity', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 65(19), pp. 9047–9055. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1235.

Korogod, N., Petersen, C. C. and Knott, G. W. (2015) 'Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfusion with cryo fixation', *eLife*, 4. doi: 10.7554/elife.05793.

Kowiański, P. *et al.* (2018) 'BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity', *Cellular and Molecular Neurobiology*. Springer US, 38(3), pp. 579–593. doi: 10.1007/s10571-017-0510-4.

Krämer, O. H. *et al.* (2012) 'SIAH proteins: critical roles in leukemogenesis', *Leukemia 2012 27:4*. Nature Publishing Group, 27(4), pp. 792–802. doi: 10.1038/leu.2012.284.

Krishnan, J. *et al.* (2009) 'Activation of a HIF1 α -PPAR γ Axis Underlies the Integration of Glycolytic and Lipid Anabolic Pathways in Pathologic Cardiac Hypertrophy', *Cell Metabolism*. Elsevier, 9(6), pp. 512–524. doi: 10.1016/j.cmet.2009.05.005.

Krishnan, J. *et al.* (2012) 'Dietary obesity-associated Hif1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 26(3), pp. 259–70. doi: 10.1101/gad.180406.111.

Kurihara, H. *et al.* (1997) 'Impaired parallel fiber-->Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor delta2 subunit.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 17(24), pp. 9613–23. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-24-09613.1997.

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.

De La Monte, S. M. and Wands, J. R. (2008) 'Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed', *Journal of Diabetes Science and Technology*. Diabetes Technology Society, pp. 1101–1113. doi: 10.1177/193229680800200619.

Laughlin, S. B., De Ruyter Van Steveninck, R. R. and Anderson, J. C. (1998) 'The metabolic cost of neural information', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 1(1), pp. 36–41. doi: 10.1038/236.

Lee, A. *et al.* (2018) 'Emerging roles of mitochondria in synaptic transmission and neurodegeneration', *Current Opinion in Physiology*. Elsevier, pp. 82–93. doi: 10.1016/j.cophys.2018.03.009.

Leen, W. G. *et al.* (2010) 'Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder', *Brain*. Narnia, 133(3), pp. 655–670. doi: 10.1093/brain/awp336.

Legros, F. *et al.* (2002) 'Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by T. D. Fox, 13(12), pp. 4343–4354. doi: 10.1091/mbc.E02-06-0330.

Lein, P. J., Banker, G. A. and Higgins, D. (1992) 'Laminin selectively enhances axonal growth and accelerates the development of polarity by hippocampal neurons in culture', *Developmental Brain Research*. Elsevier, 69(2), pp. 191–197. doi: 10.1016/0165-3806(92)90159-T.

Léveillé, F. *et al.* (2010) 'Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity', *Journal of Neuroscience*. Europe PMC Funders, 30(7), pp. 2623–2635. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5115-09.2010.

Li, C.-T. *et al.* (2015) 'Prefrontal glucose metabolism in medication-resistant major depression', *British Journal of Psychiatry*. Cambridge University Press, 206(4), pp. 316–323. doi: 10.1192/bjp.bp.113.140434.

Li, C. *et al.* (2017) 'Mutual regulation between Polo-like kinase 3 and SIAH2 E3 ubiquitin ligase defines a regulatory network that fine-tunes the cellular response to hypoxia and nickel', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 292(27), pp. 11431–11444. doi: 10.1074/jbc.M116.767178.

Li, L. *et al.* (2014) 'Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) is required for neural stem cell maintenance and vascular stability in the adult mouse SVZ.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 34(50), pp. 16713–9.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.4590-13.2014.

Li, S. *et al.* (2009) 'TORC1 Regulates Activity-Dependent CREB-Target Gene Transcription and Dendritic Growth of Developing Cortical Neurons', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 29(8), pp. 2334–2343. doi: 10.1523/jneurosci.2296-08.2009.

Li, Y. *et al.* (2009) 'HUMMR, a hypoxia- and HIF-1alpha-inducible protein, alters mitochondrial distribution and transport.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 185(6), pp. 1065–81. doi: 10.1083/jcb.200811033.

Li, Y. huan *et al.* (2018) 'PKM2, a potential target for regulating cancer', *Gene*, pp. 48–53. doi: 10.1016/j.gene.2018.05.038.

Li, Y. X. *et al.* (1998) 'Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 18(24), pp. 10231–40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-24-10231.1998.

Liao, G.-Y. *et al.* (2015) 'Brain-derived neurotrophic factor is required for axonal growth of selective groups of neurons in the arcuate nucleus.', *Molecular metabolism*. Elsevier, 4(6), pp. 471–82. doi: 10.1016/j.molmet.2015.03.003.

Lin, M. Y. and Sheng, Z. H. (2015) 'Regulation of mitochondrial transport in neurons', *Experimental Cell Research*. Academic Press, pp. 35–44. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.01.004.

Lin, Y.-C. and Koleske, A. J. (2010) 'Mechanisms of Synapse and Dendrite Maintenance and Their Disruption in Psychiatric and Neurodegenerative Disorders', *Annual Review of Neuroscience*. Annual Reviews , 33(1), pp. 349–378. doi: 10.1146/annurev-neuro-060909-153204.

Lisy, K. and Peet, D. J. (2008) 'Turn me on: regulating HIF transcriptional activity', *Cell Death & Differentiation*. Nature Publishing Group, 15(4), pp. 642–649. doi: 10.1038/sj.cdd.4402315.

Liu, J. P. *et al.* (1993) 'Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)', *Cell*. Cell Press, 75(1), pp. 59–72. doi: 10.1016/S0092-8674(05)80084-4.

Liu, Y. *et al.* (2017) 'A Sensitized IGF1 Treatment Restores Corticospinal Axon-Dependent Functions', *Neuron*. Elsevier, 95(4), pp. 817-833.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.037.

Lodhi, I. J. and Semenkovich, C. F. (2014) 'Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling.', *Cell metabolism*. Elsevier, 19(3), pp. 380–92. doi:

10.1016/j.cmet.2014.01.002.

Lohmann, C., Myhr, K. L. and Wong, R. O. L. (2002) 'Transmitter-evoked local calcium release stabilizes developing dendrites', *Nature*. Nature Publishing Group, 418(6894), pp. 177–181. doi: 10.1038/nature00850.

Lonze, B. E. *et al.* (2002) 'Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB.', *Neuron*. Elsevier, 34(3), pp. 371–85. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00686-4.

Lonze, B. E. and Ginty, D. D. (2002) 'Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system', *Neuron*. Cell Press, pp. 605–623. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00828-0.

López-Doménech, G. *et al.* (2016) 'Loss of Dendritic Complexity Precedes Neurodegeneration in a Mouse Model with Disrupted Mitochondrial Distribution in Mature Dendrites', *Cell Reports*. Elsevier, 17(2), pp. 317–327. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.004.

López-Doménech, G. *et al.* (2018) 'Miro proteins coordinate microtubule- and actin-dependent mitochondrial transport and distribution', *The EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 37(3), pp. 321–336. doi: 10.15252/embj.201696380.

Love, D. C. and Hanover, J. A. (2005) 'The Hexosamine Signaling Pathway: Deciphering the "O-GlcNAc Code"', *Science Signaling*. American Association for the Advancement of Science, 2005(312), pp. re13–re13. doi: 10.1126/stke.3122005re13.

Lu, C.-W. *et al.* (2008) 'Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 283(42), pp. 28106–14. doi: 10.1074/jbc.M803508200.

Lu, H., Forbes, R. A. and Verma, A. (2002) 'Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 277(26), pp. 23111–5. doi: 10.1074/jbc.M202487200.

Lundgaard, I. *et al.* (2015) 'Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism', *Nature Communications*, 6(1), p. 6807. doi: 10.1038/ncomms7807.

Lunt, S. Y. and Vander Heiden, M. G. (2011) 'Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Annual Reviews, 27(1), pp. 441–464. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.

Luo, W. *et al.* (2011) 'Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1', *Cell*, 145(5), pp. 732–744. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.054.

Lutas, A. and Yellen, G. (2013) 'The ketogenic diet: Metabolic influences on brain excitability and epilepsy', *Trends in Neurosciences*. Elsevier, pp. 32–40. doi: 10.1016/j.tins.2012.11.005.

Maday, S. *et al.* (2014) 'Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation.', *Neuron*. Elsevier, 84(2), pp. 292–309. doi: 10.1016/j.neuron.2014.10.019.

Maday, S., Wallace, K. E. and Holzbaur, E. L. F. (2012) 'Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 196(4), pp. 407–17. doi: 10.1083/jcb.201106120.

Madsen, P. L. *et al.* (1999) 'Cerebral oxygen/glucose ratio is low during sensory stimulation and rises above normal during recovery: Excess glucose consumption during stimulation is not accounted for by lactate efflux from or accumulation in brain tissue', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 19(4), pp. 393–400. doi: 10.1097/00004647-199904000-00005.

Magistretti, P. J. *et al.* (1993) 'Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: Implications for the metabolic trafficking between neural cells', *Developmental Neuroscience*. Karger Publishers, 15(3–5), pp. 306–312. doi: 10.1159/000111349.

Magistretti, P. J. and Allaman, I. (2015) 'A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging.', *Neuron*. Elsevier, 86(4), pp. 883–901. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.035.

Mahon, P. C., Hirota, K. and Semenza, G. L. (2001) 'FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15(20), pp. 2675–86. doi: 10.1101/gad.924501.

Majewski, N. *et al.* (2004) 'Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak.', *Molecular cell*. Elsevier, 16(5), pp. 819–30. doi: 10.1016/j.molcel.2004.11.014.

Majmundar, A. J., Wong, W. J. and Simon, M. C. (2010) 'Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress.', *Molecular cell*. Elsevier, 40(2), pp. 294–309. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.022.

Mandal, A. and Drerup, C. M. (2019) 'Axonal Transport and Mitochondrial Function in Neurons', *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers, 13, p. 373. doi: 10.3389/fncel.2019.00373.

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.

Marland, J. R. K. *et al.* (2016) 'Mitochondrial calcium uptake modulates synaptic vesicle endocytosis in central nerve terminals', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 291(5), pp. 2080–2086. doi: 10.1074/jbc.M115.686956.

Marvaldi, L. *et al.* (2015) 'Enhanced axon outgrowth and improved long-distance axon regeneration in sprouty2 deficient mice', *Developmental Neurobiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 75(3), pp. 217–231. doi: 10.1002/dneu.22224.

Matés, J. M. *et al.* (2019) 'Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Academic Press. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.05.012.

Mathieu, J. and Ruohola-Baker, H. (2017) 'Metabolic remodeling during the loss and acquisition of pluripotency.', *Development (Cambridge, England)*. Oxford University Press for The Company of Biologists Limited, 144(4), pp. 541–551. doi: 10.1242/dev.128389.

Mathupala, S. P., Rempel, A. and Pedersen, P. L. (2001) 'Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 276(46), pp. 43407–12. doi: 10.1074/jbc.M108181200.

Mattson, M. P., Gleichmann, M. and Cheng, A. (2008) 'Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders.', *Neuron*. Elsevier, 60(5), pp. 748–66. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.010.

Maxwell, P. H. *et al.* (1999) 'The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis', *Nature*. Nature Publishing Group, 399(6733), pp. 271–275. doi: 10.1038/20459.

McAllister, A. K. (2000) 'Cellular and Molecular Mechanisms of Dendrite Growth', *Cerebral Cortex*. Narnia, 10(10), pp. 963–973. doi: 10.1093/cercor/10.10.963.

McAllister, A. K., Katz, L. C. and Lo, D. C. (1996) 'Neurotrophin Regulation of Cortical Dendritic Growth Requires Activity', *Neuron*. Cell Press, 17(6), pp. 1057–1064. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80239-1.

Mellon, S. H. *et al.* (2019) 'Metabolomic analysis of male combat veterans with post traumatic stress disorder', *PLOS ONE*. Edited by A. Halama. Public Library of Science, 14(3), p. e0213839. doi: 10.1371/journal.pone.0213839.

Mergenthaler, P. *et al.* (2012) 'Mitochondrial hexokinase II (HKII) and phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA15) form a molecular switch governing cellular fate depending on the metabolic state', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 109(5), pp. 1518–1523. doi: 10.1073/pnas.1108225109.

Mergenthaler, P. *et al.* (2013) 'Sugar for the brain: The role of glucose in physiological and pathological brain function', *Trends in Neurosciences*. NIH Public Access, pp. 587–597. doi: 10.1016/j.tins.2013.07.001.

Meyer-Franke, A. *et al.* (1998) 'Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons', *Neuron*. NIH Public Access, 21(4), pp. 681–693. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80586-3.

Migita, T. *et al.* (2008) 'ATP Citrate Lyase: Activation and Therapeutic Implications in Non-Small Cell Lung Cancer', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 68(20), pp. 8547–8554. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1235.

Millecamps, S. and Julien, J.-P. (2013) 'Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 14(3), pp. 161–176. doi: 10.1038/nrn3380.

Minchenko, A. *et al.* (2002) 'Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect.', *The Journal of biological chemistry*. NIH Public Access, 277(8), pp. 6183–7. doi: 10.1074/jbc.M110978200.

Mizuno, H. *et al.* (2014) 'NMDAR-regulated dynamics of layer 4 neuronal dendrites during thalamocortical reorganization in neonates', *Neuron*. Elsevier, 82(2), pp. 365–379. doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.026.

Molina, C. A. *et al.* (1993) 'Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor.', *Cell*. Elsevier, 75(5), pp. 875–86. doi: 10.1016/0092-8674(93)90532-u.

Mor, I., Cheung, E. C. and Vousden, K. H. (2011) 'Control of glycolysis through regulation of PFK1: Old friends and recent additions', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 76, pp. 211–216. doi: 10.1101/sqb.2011.76.010868.

Morea, V. *et al.* (2017) 'Glucose transportation in the brain and its impairment in Huntington disease: one more shade of the energetic metabolism failure?', *Amino Acids*. Springer Vienna, pp. 1147–1157. doi: 10.1007/s00726-017-2417-2.

Moser, H. W. (1999) 'Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation', *Developmental Neuropsychology*. Narnia, pp. 369–371. doi: 10.1207/S15326942DN1603_18.

Mukodani, J., Ishikawa, Y. and Fukuzaki, H. (1990) 'Effects of hypoxia on sterol synthesis, acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity, and efflux of cholesterol in cultured rabbit skin fibroblasts.', *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, 10(1), pp. 106–110. doi: 10.1161/01.ATV.10.1.106.

Mullen, A. R. *et al.* (2012) 'Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria', *Nature*. Nature Publishing Group, 481(7381), pp. 385–388. doi: 10.1038/nature10642.

Müller, F. *et al.* (2001) 'Activation and inactivation of cAMP-response element-mediated gene transcription in cardiac myocytes', *Cardiovascular Research*. Narnia, 52(1), pp. 95–102. doi: 10.1016/S0008-6363(01)00361-3.

Murray, A. J. (2008) 'Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems.', *Science signaling*. American Association for the Advancement of Science, 1(22), p. re4. doi: 10.1126/scisignal.122re4.

Mylonis, I., Simos, G. and Paraskeva, E. (2019) 'Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism', *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 8(3), p. 214. doi: 10.3390/cells8030214.

Nagan, N. and Zoeller, R. A. (2001) 'Plasmalogens: Biosynthesis and functions', *Progress in Lipid Research*. Pergamon, pp. 199–229. doi: 10.1016/S0163-7827(01)00003-0.

Nakamuta, S. *et al.* (2011) 'Local application of neurotrophins specifies axons through inositol 1,4,5-trisphosphate, calcium, and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases', *Science Signaling*. American Association for the Advancement of Science, 4(199), p. ra76. doi: 10.1126/scisignal.2002011.

Nakatsu, D. *et al.* (2015) 'l-cysteine reversibly inhibits glucose-induced biphasic insulin secretion and ATP production by inactivating PKM2', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 112(10), pp. E1067–E1076. doi: 10.1073/pnas.1417197112.

Nakayama, K. *et al.* (2004) 'Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 α abundance, and modulates physiological responses to hypoxia', *Cell*. Elsevier, 117(7), pp. 941–952. doi: 10.1016/j.cell.2004.06.001.

Namekata, K. *et al.* (2010) 'Dock3 induces axonal outgrowth by stimulating membrane recruitment of the WAVE complex.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America. National Academy of Sciences, 107(16), pp. 7586–91. doi: 10.1073/pnas.0914514107.

Namekata, K. *et al.* (2012) ‘Dock3 stimulates axonal outgrowth via GSK-3 β -mediated microtubule assembly.’, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 32(1), pp. 264–74. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4884-11.2012.

Nguyen, L. N. *et al.* (2014) ‘Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid’, *Nature*. Nature Publishing Group, 509(7501), pp. 503–506. doi: 10.1038/nature13241.

Nieweg, K., Schaller, H. and Pfrieder, F. W. (2009) ‘Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats’, *Journal of Neurochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 109(1), pp. 125–134. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05917.x.

Noguchi, T., Inoue, H. and Tanaka, T. (1986) ‘The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing’, *Journal of Biological Chemistry*, 261(29), pp. 13807–13812. Available at: <http://www.jbc.org/content/261/29/13807.full.pdf> (Accessed: 5 August 2019).

O’Brien, J. S. and Sampson, E. L. (1965) ‘Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin.’, *Journal of lipid research*, 6(4), pp. 537–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5865382> (Accessed: 3 July 2019).

Oe, Y. *et al.* (2016) ‘Glycogen distribution in the microwave-fixed mouse brain reveals heterogeneous astrocytic patterns’, *GLIA*. John Wiley & Sons, Ltd, 64(9), pp. 1532–1545. doi: 10.1002/glia.23020.

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.

Ohira, K. *et al.* (2005) ‘A Truncated Troponin-Myosin-Related Kinase B Receptor, T1, Regulates Glial Cell Morphology via Rho GDP Dissociation Inhibitor 1’, *Journal of Neuroscience*, 25(6), pp. 1343–1353. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4436-04.2005.

De Pablo-Fernández, E. *et al.* (2017) ‘Neuroendocrine abnormalities in Parkinson’s disease.’, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. BMJ Publishing Group Ltd, 88(2), pp. 176–185. doi: 10.1136/jnnp-2016-314601.

Pagé, E. L. *et al.* (2002) ‘Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms.’, *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 277(50), pp. 48403–9. doi: 10.1074/jbc.M209114200.

Pallottini, V. *et al.* (2008) 'Regulation of HMG-CoA reductase expression by hypoxia', *Journal of Cellular Biochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, 104(3), pp. 701–709. doi: 10.1002/jcb.21757.

Palsson-Mcdermott, E. M. *et al.* (2015) 'Pyruvate kinase M2 regulates hif-1 α activity and il-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages', *Cell Metabolism*. Cell Press, 21(1), pp. 65–80. doi: 10.1016/j.cmet.2014.12.005.

Panopoulos, A. D. *et al.* (2012) 'The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming', *Cell Research*. Nature Publishing Group, 22(1), pp. 168–177. doi: 10.1038/cr.2011.177.

Papadia, S. *et al.* (2005) 'Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 25(17), pp. 4279–4287. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5019-04.2005.

Papadia, S. *et al.* (2008) 'Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 11(4), pp. 476–487. doi: 10.1038/nn2071.

Papandreou, I. *et al.* (2006) 'HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption', *Cell Metabolism*. Cell Press, 3(3), pp. 187–197. doi: 10.1016/J.CMET.2006.01.012.

Parathath, S. *et al.* (2011) 'Hypoxia is present in murine atherosclerotic plaques and has multiple adverse effects on macrophage lipid metabolism.', *Circulation research*. Lippincott Williams & WilkinsHagerstown, MD, 109(10), pp. 1141–52. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.246363.

Park, H. and Poo, M. (2013) 'Neurotrophin regulation of neural circuit development and function', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 14(1), pp. 7–23. doi: 10.1038/nrn3379.

Pascual, J. M. *et al.* (2007) 'Brain Glucose Supply and the Syndrome of Infantile Neuroglycopenia', *Archives of Neurology*. American Medical Association, 64(4), p. 507. doi: 10.1001/archneur.64.4.noc60165.

Patching, S. G. (2017) 'Glucose Transporters at the Blood-Brain Barrier: Function, Regulation and Gateways for Drug Delivery', *Molecular Neurobiology*. Springer US, pp. 1046–1077. doi: 10.1007/s12035-015-9672-6.

Patel, A. B. *et al.* (2014) 'Direct evidence for activity-dependent glucose phosphorylation in neurons with implications for the astrocyte-to-neuron lactate shuttle', *Proceedings of the National*

Academy of Sciences. National Academy of Sciences, 111(14), pp. 5385–5390. doi: 10.1073/pnas.1403576111.

Patel, M. S. *et al.* (2014) ‘The pyruvate dehydrogenase complexes: Structure-based function and regulation’, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, pp. 16615–16623. doi: 10.1074/jbc.R114.563148.

Patsouris, D. *et al.* (2004) ‘PPAR α governs glycerol metabolism’, *Journal of Clinical Investigation*, 114(1), pp. 94–103. doi: 10.1172/JCI20468.

Pekkurnaz, G. *et al.* (2014) ‘Glucose regulates mitochondrial motility via Milton modification by O-GlcNAc transferase’, *Cell*. Elsevier, 158(1), pp. 54–68. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.007.

Pellerin, L. *et al.* (1998) ‘Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle’, in *Developmental Neuroscience*. Karger Publishers, pp. 291–299. doi: 10.1159/000017324.

Pellerin, L. and 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*. National Academy of Sciences, 91(22), pp. 10625–10629. doi: 10.1073/PNAS.91.22.10625.

Pellerin, L. and Magistretti, P. J. (2012) ‘Sweet sixteen for ANLS’, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. SAGE Publications Sage UK: London, England, pp. 1152–1166. doi: 10.1038/jcbfm.2011.149.

Petanjek, Z. *et al.* (2011) ‘Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 108(32), pp. 13281–6. doi: 10.1073/pnas.1105108108.

Pfenninger, K. H. *et al.* (2003) ‘Regulation of membrane expansion at the nerve growth cone.’, *Journal of cell science*. The Company of Biologists Ltd, 116(Pt 7), pp. 1209–17. doi: 10.1242/jcs.00285.

Pfenninger, K. H. (2009) ‘Plasma membrane expansion: A neuron’s Herculean task’, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 251–261. doi: 10.1038/nrn2593.

Pfenninger, K. H. and Johnson, M. P. (1983) ‘Membrane biogenesis in the sprouting neuron. I. Selective transfer of newly synthesized phospholipid into the growing neurite.’, *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 97(4), pp. 1038–42. doi: 10.1083/jcb.97.4.1038.

Pierre, K. *et al.* (2000) ‘Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal

microscopy.', *Neuroscience*. Pergamon, 100(3), pp. 617–27. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00294-3.

Pierre, K. and Pellerin, L. (2005) 'Monocarboxylate transporters in the central nervous system: Distribution, regulation and function', *Journal of Neurochemistry*, pp. 1–14. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x.

Pietrocola, F. *et al.* (2015) 'Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger.', *Cell metabolism*. Elsevier, 21(6), pp. 805–21. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.014.

Popoli, M. *et al.* (2012) 'The stressed synapse: The impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission', *Nature Reviews Neuroscience*, pp. 22–37. doi: 10.1038/nrn3138.

Porporato, P. E. *et al.* (2011) 'Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: A comprehensive review', *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers, AUG, p. 49. doi: 10.3389/fphar.2011.00049.

Poulopoulos, A. *et al.* (2019) 'Subcellular transcriptomes and proteomes of developing axon projections in the cerebral cortex', *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 356–360. doi: 10.1038/s41586-018-0847-y.

Poulos, A. *et al.* (1986) 'Prenatal diagnosis of Zellweger syndrome and related disorders: Impaired degradation of phytanic acid', *European Journal of Pediatrics*, 145(6), pp. 507–510. doi: 10.1007/BF02429053.

Prithviraj, R. and Inglis, F. M. (2008) 'Expression of the N-methyl-d-aspartate receptor subunit NR3B regulates dendrite morphogenesis in spinal motor neurons', *Neuroscience*. Pergamon, 155(1), pp. 145–153. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.089.

Qi, J. *et al.* (2008) 'The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 105(43), pp. 16713–8. doi: 10.1073/pnas.0804063105.

Rai, A. *et al.* (2018) 'Glycogen synthase protects neurons from cytotoxicity of mutant huntingtin by enhancing the autophagy flux', *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group, 9(2), p. 201. doi: 10.1038/s41419-017-0190-5.

Rajakumar, A. *et al.* (2004) 'Trans-activators regulating neuronal glucose transporter isoform-3 gene expression in mammalian neurons.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 279(25), pp. 26768–79. doi: 10.1074/jbc.M402735200.

Rajan, I. and Cline, H. T. (1998) 'Glutamate Receptor Activity is Required for Normal Development of', *Tectal Cell Dendrites In Vivo. Journal of Neuroscience*, 18(19), pp. 7836–7846. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742152> (Accessed: 14 July 2019).

Rangaraju, V., Calloway, N. and Ryan, T. A. (2014) 'Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function.', *Cell*. Elsevier, 156(4), pp. 825–35. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.042.

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.

Rivas, R. J., Burmeister, D. W. and Goldberg, D. J. (1992) 'Rapid effects of laminin on the growth cone.', *Neuron*. Elsevier, 8(1), pp. 107–15. doi: 10.1016/0896-6273(92)90112-Q.

Robey, R. B. and Hay, N. (2006) 'Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt', *Oncogene*. Nature Publishing Group, pp. 4683–4696. doi: 10.1038/sj.onc.1209595.

Rodriguez-Rodriguez, P. *et al.* (2012) 'Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose-phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration', *Cell Death & Differentiation*. Nature Publishing Group, 19(10), pp. 1582–1589. doi: 10.1038/cdd.2012.33.

Rodriguez-Rodriguez, P., Almeida, A. and Bolaños, J. P. (2013) 'Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: Role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway', *Neurochemistry International*, pp. 750–756. doi: 10.1016/j.neuint.2013.02.005.

Rodríguez-Rodríguez, R. A. *et al.* (2004) 'The neurotrophic effect of oleic acid includes dendritic differentiation and the expression of the neuronal basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD2', *Journal of Neurochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 88(5), pp. 1041–1051. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02262.x.

Ros, S. and Schulze, A. (2013) 'Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism.', *Cancer & metabolism*. BioMed Central, 1(1), p. 8. doi: 10.1186/2049-3002-1-8.

Rose, C. R. *et al.* (2003) 'Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells', *Nature*, 426(6962), pp. 74–78. doi: 10.1038/nature01983.

Ruthel, G. and Hollenbeck, P. J. (2003) 'Response of mitochondrial traffic to axon determination and differential branch growth', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 23(24), pp. 8618–8624. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-24-08618.2003.

Ryan, H. E., Lo, J. and Johnson, R. S. (1998) 'HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization', *EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 17(11), pp. 3005–3015. doi: 10.1093/emboj/17.11.3005.

Saez, I. *et al.* (2014) 'Neurons have an active glycogen metabolism that contributes to tolerance to hypoxia', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 34(6), pp. 945–955. doi: 10.1038/jcbfm.2014.33.

Safran, M. *et al.* (2006) 'Mouse model for noninvasive imaging of HIF prolyl hydroxylase activity: Assessment of an oral agent that stimulates erythropoietin production', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1), pp. 105–110. doi: 10.1073/pnas.0509459103.

Salani, B. *et al.* (2015) 'IGF1 regulates PKM2 function through Akt phosphorylation', *Cell Cycle*. Taylor & Francis, 14(10), pp. 1559–1567. doi: 10.1080/15384101.2015.1026490.

Salem, N. *et al.* (2001) 'Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system', *Lipids*. Springer-Verlag, 36(9), pp. 945–959. doi: 10.1007/s11745-001-0805-6.

Salmond, R. J. (2018) 'mTOR Regulation of Glycolytic Metabolism in T Cells', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media SA, 6, p. 122. doi: 10.3389/fcell.2018.00122.

Sands, W. A. and Palmer, T. M. (2008) 'Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation', *Cellular Signalling*. Pergamon, pp. 460–466. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.10.005.

Saunier, E., Benelli, C. and Bortoli, S. (2016) 'The pyruvate dehydrogenase complex in cancer: An old metabolic gatekeeper regulated by new pathways and pharmacological agents', *International Journal of Cancer*, pp. 809–817. doi: 10.1002/ijc.29564.

Saxton, W. M. *et al.* (2012) 'The axonal transport of mitochondria.', *Journal of cell science*. The Company of Biologists Ltd, 125(Pt 9), pp. 2095–104. doi: 10.1242/jcs.053850.

Schito, L. and Semenza, G. L. (2016) 'Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression', *Trends in Cancer*. Elsevier, pp. 758–770. doi: 10.1016/j.trecan.2016.10.016.

Schoors, S. *et al.* (2014) 'Partial and Transient Reduction of Glycolysis by PFKFB3 Blockade Reduces Pathological Angiogenesis', *Cell Metabolism*. Cell Press, 19(1), pp. 37–48. doi: 10.1016/J.CMET.2013.11.008.

Schwartz, P. M. *et al.* (1997) 'Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF(-/-) mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning', *Neuron*. Cell Press, 19(2), pp. 269–281. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80938-1.

Segarra-Mondejar, M. *et al.* (2018) 'Synaptic activity-induced glycolysis facilitates membrane

lipid provision and neurite outgrowth', *The EMBO Journal*. EMBO Press, 37(9), p. e97368. doi: 10.15252/embj.201797368.

Semba, H. *et al.* (2016) 'HIF-1 α -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity.', *Nature communications*. Nature Publishing Group, 7, p. 11635. doi: 10.1038/ncomms11635.

Semenza, G. L. *et al.* (1994) 'Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1.', *The Journal of biological chemistry*, 269(38), pp. 23757–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8089148> (Accessed: 22 July 2019).

Semenza, G. L. *et al.* (1996) 'Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 271(51), pp. 32529–37. doi: 10.1074/jbc.271.51.32529.

Semenza, G. L. (2012) 'Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine', *Cell*. Elsevier, 148(3), pp. 399–408. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.021.

Semenza, G. L. (2017) 'Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype', *The EMBO Journal*. European Molecular Biology Organization, 36(3), pp. 252–259. doi: 10.15252/embj.201695204.

Semple, B. D. *et al.* (2013) 'Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species.', *Progress in neurobiology*. NIH Public Access, 106–107, pp. 1–16. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.001.

Serita, T., Fukushima, H. and Kida, S. (2017) 'Constitutive activation of CREB in mice enhances temporal association learning and increases hippocampal CA1 neuronal spine density and complexity', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 42528. doi: 10.1038/srep42528.

Shen, G. and Li, X. (2017) 'The Multifaceted Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF1) in Lipid Metabolism', in *Hypoxia and Human Diseases*. InTech. doi: 10.5772/65340.

Shen, X. *et al.* (2012) 'The Relationship between Cerebral Glucose Metabolism and Age: Report of a Large Brain PET Data Set', *PLoS ONE*. Edited by Y. Fan. Public Library of Science, 7(12), p. e51517. doi: 10.1371/journal.pone.0051517.

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.

Sheng, Z. H. and Cai, Q. (2012) 'Mitochondrial transport in neurons: Impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 77–93. doi: 10.1038/nrn3156.

Shyh-Chang, N., Daley, G. Q. and Cantley, L. C. (2013) 'Stem cell metabolism in tissue development and aging', *Development*. Oxford University Press for The Company of Biologists Limited, 140(12), pp. 2535–2547. doi: 10.1242/DEV.091777.

Silbereis, J. C. *et al.* (2016) 'The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System', *Neuron*. Elsevier, p. 248. doi: 10.1016/j.neuron.2015.12.008.

Silver, I. A. and 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*. Society for Neuroscience, 14(8), pp. 5068–76. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-08-05068.1994.

Simón, M. V. *et al.* (2016) 'Synthesis of docosahexaenoic acid from eicosapentaenoic acid in retina neurons protects photoreceptors from oxidative stress', *Journal of Neurochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 136(5), pp. 931–946. doi: 10.1111/jnc.13487.

Simpson, I. A. *et al.* (2008) 'The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. American Physiological Society, 295(2), pp. E242–E253. doi: 10.1152/ajpendo.90388.2008.

Simpson, I. A., Carruthers, A. and Vannucci, S. J. (2007) 'Supply and demand in cerebral energy metabolism: The role of nutrient transporters', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. SAGE Publications Sage UK: London, England, pp. 1766–1791. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600521.

Smith, G. M. and Gallo, G. (2018) 'The role of mitochondria in axon development and regeneration', *Developmental Neurobiology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 221–237. doi: 10.1002/dneu.22546.

Smith, J. J. and Aitchison, J. D. (2013) 'Peroxisomes take shape', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 14(12), pp. 803–817. doi: 10.1038/nrm3700.

Solís-Maldonado, M. *et al.* (2018) 'Altered lactate metabolism in Huntington's disease is dependent on GLUT3 expression', *CNS Neuroscience & Therapeutics*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 24(4), pp. 343–352. doi: 10.1111/cns.12837.

Son, G. and Han, J. (2018) 'Roles of mitochondria in neuronal development.', *BMB reports*. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology, 51(11), pp. 549–556. doi:

10.5483/BMBREP.2018.51.11.226.

Soriano, F. X. *et al.* (2008) 'Specific Targeting of Pro-Death NMDA Receptor Signals with Differing Reliance on the NR2B PDZ Ligand', *Journal of Neuroscience*. NIH Public Access, 28(42), pp. 10696–10710. doi: 10.1523/jneurosci.1207-08.2008.

Soro-Arnaiz, I. *et al.* (2016) 'Role of Mitochondrial Complex IV in Age-Dependent Obesity.', *Cell reports*. Elsevier, 16(11), pp. 2991–3002. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.041.

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*. Narnia. doi: 10.1093/jnci/djx071.

Stanton, R. C. (2012) 'Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival', *IUBMB Life*. NIH Public Access, pp. 362–369. doi: 10.1002/iub.1017.

Stiles, J. and Jernigan, T. L. (2010) 'The basics of brain development.', *Neuropsychology review*. Springer, 20(4), pp. 327–48. doi: 10.1007/s11065-010-9148-4.

Stincone, A. *et al.* (2015) 'The return of metabolism: Biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway', *Biological Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 90(3), pp. 927–963. doi: 10.1111/brv.12140.

Stowers, R. S. *et al.* (2002) 'Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel Drosophila protein', *Neuron*. Cell Press, 36(6), pp. 1063–1077. doi: 10.1016/S0896-6273(02)01094-2.

Südhof, T. C. (2018) 'Towards an Understanding of Synapse Formation', *Neuron*. Cell Press, pp. 276–293. doi: 10.1016/j.neuron.2018.09.040.

Südhof, T. C. and Malenka, R. C. (2008) 'Understanding Synapses: Past, Present, and Future', *Neuron*. Elsevier, pp. 469–476. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.011.

Sugden, M. C. and Holness, M. J. (2003) 'Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 284(5), pp. E855–E862. doi: 10.1152/ajpendo.00526.2002.

Sun, R. C. and Denko, N. C. (2014) 'Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth', *Cell Metabolism*. NIH Public Access, 19(2), pp. 285–292. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.022.

Szablewski, L. (2017) 'Glucose Transporters in Brain: In Health and in Alzheimer's Disease', *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press, pp. 1307–1320. doi: 10.3233/JAD-160841.

Tang, B. L. (2019) 'Neuroprotection by glucose-6-phosphate dehydrogenase and the pentose phosphate pathway', *Journal of Cellular Biochemistry*, p. jcb.29004. doi: 10.1002/jcb.29004.

Tang, M. *et al.* (2017) 'Brain microvasculature defects and Glut1 deficiency syndrome averted by early repletion of the glucose transporter-1 protein', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8(1), p. 14152. doi: 10.1038/ncomms14152.

Tao, X. *et al.* (1998) 'Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism', *Neuron*. Elsevier, 20(4), pp. 709–726. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81010-7.

Tefera, T. W. and Borges, K. (2018) 'Neuronal glucose metabolism is impaired while astrocytic TCA cycling is unaffected at symptomatic stages in the hSOD1^{G93A} mouse model of amyotrophic lateral sclerosis', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, p. 0271678X1876477. doi: 10.1177/0271678X18764775.

Teslaa, T. and Teitell, M. A. (2014) 'Techniques to monitor glycolysis', in *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 91–114. doi: 10.1016/B978-0-12-416618-9.00005-4.

Thermo Fisher Scientific (2015) *How Cationic Lipid Mediated Transfection Works*, *Life Technologies*. Available at: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/gene-delivery-technologies/cationic-lipid-mediated-delivery/how-cationic-lipid-mediated-transfection-works.html> (Accessed: 22 September 2019).

Tillander, V., Alexson, S. E. H. and Cohen, D. E. (2017) 'Deactivating Fatty Acids: Acyl-CoA Thioesterase-Mediated Control of Lipid Metabolism.', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. Elsevier, 28(7), pp. 473–484. doi: 10.1016/j.tem.2017.03.001.

Tomita, S. *et al.* (2003) 'Defective Brain Development in Mice Lacking the Hif-1 Gene in Neural Cells', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology (ASM), 23(19), pp. 6739–6749. doi: 10.1128/mcb.23.19.6739-6749.2003.

Tonge, D. A. *et al.* (1997) 'Effects of Extracellular Matrix Components on Axonal Outgrowth from Peripheral Nerves of Adult Animals in Vitro', *Experimental Neurology*. Academic Press, 146(1), pp. 81–90. doi: 10.1006/EXNR.1997.6498.

Tracey, T. J. *et al.* (2018) 'Neuronal Lipid Metabolism: Multiple Pathways Driving Functional Outcomes in Health and Disease', *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media SA, 11, p. 10. doi: 10.3389/fnmol.2018.00010.

Trigo, D., Goncalves, M. B. and Corcoran, J. P. T. (2019) 'The regulation of mitochondrial dynamics in neurite outgrowth by retinoic acid receptor β signaling', *FASEB journal : official*

publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. Federation of American Societies for Experimental Biology Bethesda, MD, USA, 33(6), pp. 7225–7235. doi: 10.1096/fj.201802097R.

Vaarmann, A. *et al.* (2016) ‘Mitochondrial biogenesis is required for axonal growth’, *Development (Cambridge)*. Oxford University Press for The Company of Biologists Limited, 143(11), pp. 1981–1992. doi: 10.1242/dev.128926.

Vaishnavi, S. N. *et al.* (2010) ‘Regional aerobic glycolysis in the human brain.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 107(41), pp. 17757–62. doi: 10.1073/pnas.1010459107.

Vance, J. E., Campenot, R. B. and Vance, D. E. (2000) ‘The synthesis and transport of lipids for axonal growth and nerve regeneration’, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier, pp. 84–96. doi: 10.1016/S1388-1981(00)00050-0.

Vannucci, S. J. *et al.* (1998) ‘Glucose transporter expression in brain: Relationship to cerebral glucose utilization’, in *Developmental Neuroscience*. Karger Publishers, pp. 369–379. doi: 10.1159/000017333.

Vilchez, D. *et al.* (2007) ‘Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy’, *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 10(11), pp. 1407–1413. doi: 10.1038/nn1998.

Vlassenko, A. G. *et al.* (2018) ‘Aerobic glycolysis and tau deposition in preclinical Alzheimer’s disease’, *Neurobiology of Aging*, 67, pp. 95–98. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.03.014.

Volkmar, F. R. and Greenough, W. T. (1972) ‘Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat’, *Science*. American Association for the Advancement of Science, 176(4042), pp. 1445–1447. doi: 10.1126/science.176.4042.1445.

Volpe, J. J. and Adams, R. D. (1972) ‘Cerebro-hepato-renal syndrome of Zellweger: An inherited disorder of neuronal migration’, *Acta Neuropathologica*. Springer-Verlag, 20(3), pp. 175–198. doi: 10.1007/BF00686900.

De Vries, M. G. *et al.* (2003) ‘Extracellular Glucose in Rat Ventromedial Hypothalamus during Acute and Recurrent Hypoglycemia’, *Diabetes*. American Diabetes Association, 52(11), pp. 2767–2773. doi: 10.2337/diabetes.52.11.2767.

Waite, A. E. *et al.* (2017) ‘Emerging Roles for Glycogen in the CNS’, *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers, 10, p. 73. doi: 10.3389/fnmol.2017.00073.

Wamelink, M. M. C., Struys, E. A. and Jakobs, C. (2008) 'The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: A review', *Journal of Inherited Metabolic Disease*. John Wiley & Sons, Ltd, 31(6), pp. 703–717. doi: 10.1007/s10545-008-1015-6.

Wanders, R. J. A. *et al.* (2001) 'Peroxisomal fatty acid α - and β -oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases', *Biochemical Society Transactions*, 29(2), p. 250. doi: 10.1042/0300-5127:0290250.

Wanders, R. J. A. and Waterham, H. R. (2006) 'Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited', *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews, 75(1), pp. 295–332. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133329.

Wang, G. L. *et al.* (1995) 'Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 92(12), pp. 5510–4. doi: 10.1073/pnas.92.12.5510.

Wang, Y. *et al.* (2017) 'O-GlcNAcylation destabilizes the active tetrameric PKM2 to promote the Warburg effect.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 114(52), pp. 13732–13737. doi: 10.1073/pnas.1704145115.

Wayman, G. A. *et al.* (2006) 'Activity-Dependent Dendritic Arborization Mediated by CaM-Kinase I Activation and Enhanced CREB-Dependent Transcription of Wnt-2', *Neuron*. Cell Press, 50(6), pp. 897–909. doi: 10.1016/j.neuron.2006.05.008.

Weiler, A. *et al.* (2017) 'Metabolite transport across the mammalian and insect brain diffusion barriers', *Neurobiology of Disease*, pp. 15–31. doi: 10.1016/j.nbd.2017.02.008.

Weinhofer, I. (2002) 'Cholesterol regulates ABCD2 expression: implications for the therapy of X-linked adrenoleukodystrophy', *Human Molecular Genetics*. Narnia, 11(22), pp. 2701–2708. doi: 10.1093/hmg/11.22.2701.

Wellen, K. E. *et al.* (2010) 'The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism', *Genes and Development*, 24(24), pp. 2784–2799. doi: 10.1101/gad.1985910.

Weng, H. *et al.* (2013) 'Pex11 α deficiency impairs peroxisome elongation and division and contributes to nonalcoholic fatty liver in mice', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. American Physiological Society Bethesda, MD, 304(2), pp. E187–E196. doi: 10.1152/ajpendo.00425.2012.

Wenger, R. H. *et al.* (1997) 'Hypoxia-inducible factor-1 α is regulated at the post-mRNA

level', *Kidney International*, 51(2), pp. 560–563. doi: 10.1038/ki.1997.79.

White, R. J. *et al.* (1996) 'Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 16(18), pp. 5688–97. doi: 20026597.

Williams, A. L. *et al.* (2018) 'HIF1 mediates a switch in pyruvate kinase isoforms after myocardial infarction', *Physiological Genomics*. American Physiological Society Bethesda, MD, 50(7), pp. 479–494. doi: 10.1152/physiolgenomics.00130.2017.

Wilson Horch, H. *et al.* (1999) 'Destabilization of Cortical Dendrites and Spines by BDNF', *Neuron*. Cell Press, 23(2), pp. 353–364. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80785-0.

Wilson, J. E. (2003) 'Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function.', *The Journal of experimental biology*. The Company of Biologists Ltd, 206(Pt 12), pp. 2049–57. doi: 10.1242/JEB.00241.

Wong, R. O. L. and Ghosh, A. (2002) 'Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 3(10), pp. 803–812. doi: 10.1038/nrn941.

Wrigley, S., Arafa, D. and Tropea, D. (2017) 'Insulin-Like Growth Factor 1: At the Crossroads of Brain Development and Aging.', *Frontiers in cellular neuroscience*. Frontiers Media SA, 11, p. 14. doi: 10.3389/fncel.2017.00014.

Xiang, Y. *et al.* (2011) 'Insulin-Like Growth Factor-1 Regulates Neurite Outgrowth and Neuronal Migration From Organotypic Cultured Dorsal Root Ganglion', *International Journal of Neuroscience*. Taylor & Francis, 121(2), pp. 101–106. doi: 10.3109/00207454.2010.535935.

Xu, D. *et al.* (2010) 'Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1 α ', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 285(50), pp. 38944–38950. doi: 10.1074/jbc.M110.160325.

Yamada, K. *et al.* (2007) 'A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells', *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 2(3), pp. 753–762. doi: 10.1038/nprot.2007.76.

Yan, X. *et al.* (2016) 'CaMKII-Mediated CREB phosphorylation is involved in Ca²⁺-Induced BDNF mRNA transcription and neurite outgrowth promoted by electrical stimulation', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(9), p. e0162784. doi: 10.1371/journal.pone.0162784.

Yan, Z. *et al.* (2016) 'Synaptic Actin Dysregulation, a Convergent Mechanism of Mental

Disorders?', *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 36(45), pp. 11411–11417. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2360-16.2016.

Yang, C. *et al.* (2014) 'Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport', *Molecular Cell*. Elsevier, 56(3), pp. 414–424. doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.025.

Yang, G., Pan, F. and Gan, W. B. (2009) 'Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories', *Nature*. Nature Publishing Group, 462(7275), pp. 920–924. doi: 10.1038/nature08577.

Yang, L., Venneti, S. and Nagrath, D. (2017) 'Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism', *Annual Review of Biomedical Engineering*. Annual Reviews, 19(1), pp. 163–194. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044546.

Yang, W. and Lu, Z. (2015) 'Pyruvate kinase M2 at a glance', *Journal of Cell Science*. The Company of Biologists Ltd, 128(9), pp. 1655–1660. doi: 10.1242/jcs.166629.

Ye, J. *et al.* (2012) 'Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.', *BMC bioinformatics*. BioMed Central, 13, p. 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.

Yellen, G. (2018) 'Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism', *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press, pp. 2235–2246. doi: 10.1083/jcb.201803152.

Yucel, N. *et al.* (2019) 'Glucose Metabolism Drives Histone Acetylation Landscape Transitions that Dictate Muscle Stem Cell Function.', *Cell reports*. Elsevier, 27(13), pp. 3939–3955.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.092.

Zaidi, N., Swinnen, J. V. and Smans, K. (2012) 'ATP-Citrate Lyase: A Key Player in Cancer Metabolism', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 72(15), pp. 3709–3714. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4112.

Zala, D. *et al.* (2013) 'Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport.', *Cell*. Elsevier, 152(3), pp. 479–91. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.029.

Zanirati, G. *et al.* (2018) 'Depression comorbidity in epileptic rats is related to brain glucose hypometabolism and hypersynchronicity in the metabolic network architecture', *Epilepsia*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 59(5), pp. 923–934. doi: 10.1111/epi.14057.

Zenisek, D. and Matthews, G. (2000) 'The role of mitochondria in presynaptic calcium handling at a ribbon synapse', *Neuron*. Cell Press, 25(1), pp. 229–237. doi: 10.1016/S0896-

6273(00)80885-5.

Zhang, L. *et al.* (2016) 'Hypoxia-inducible factor-1 α contributes to dendritic overgrowth in tuberous sclerosis', *Neuroscience Letters*. Elsevier, 612, pp. 43–47. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.038.

Zhang, Q. *et al.* (2017) 'The substrate binding domains of human SIAH E3 ubiquitin ligases are now crystal clear', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier, 1861(1), pp. 3095–3105. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.10.019.

Zhang, S. J. *et al.* (2007) 'Decoding NMDA Receptor Signaling: Identification of Genomic Programs Specifying Neuronal Survival and Death', *Neuron*, 53(4), pp. 549–562. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.025.

Zhang, W. *et al.* (2017) 'Quantification of lactate from various metabolic pathways and quantification issues of lactate isotopologues and isotopomers', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 8489. doi: 10.1038/s41598-017-08277-3.

Zhang, Y. *et al.* (2019) 'Elevating Growth Factor Responsiveness and Axon Regeneration by Modulating Presynaptic Inputs', *Neuron*. Elsevier, 103(1), pp. 39-51.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2019.04.033.

Zhao, N. *et al.* (2017) 'Apolipoprotein E4 Impairs Neuronal Insulin Signaling by Trapping Insulin Receptor in the Endosomes', *Neuron*. Elsevier, 96(1), pp. 115-129.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.003.

Zheng, W. H. and Quirion, R. (2004) 'Comparative signaling pathways of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons and the role of the PI3 kinase pathway in cell survival', *Journal of Neurochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 89(4), pp. 844–852. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02350.x.

Zheng, W. H. and Quirion, R. (2006) 'Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induces the activation/phosphorylation of Akt kinase and cAMP response element-binding protein (CREB) by activating different signaling pathways in PC12 cells', *BMC Neuroscience*. BioMed Central, 7(1), p. 51. doi: 10.1186/1471-2202-7-51.

Zheng, Y. *et al.* (2019) 'Somatic autophagy of axonal mitochondria in ischemic neurons', *J Cell Biol*. Rockefeller University Press, p. jcb.201804101. doi: 10.1083/JCB.201804101.

Ziegler, A. B. *et al.* (2017) 'Cell-Autonomous Control of Neuronal Dendrite Expansion via the Fatty Acid Synthesis Regulator SREBP', *Cell Reports*. Elsevier, 21(12), pp. 3346–3353. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.069.

Zuloaga, R. *et al.* (2013) 'The cAMP Response Element Binding protein (CREB) is activated by Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) and regulates myostatin gene expression in skeletal myoblast', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 440(2), pp. 258–264. doi: 10.1016/J.BBRC.2013.09.067.

Zuo, Y. *et al.* (2005) 'Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex', *Neuron*. Cell Press, 46(2), pp. 181–189. doi: 10.1016/j.neuron.2005.04.001.

12. ANEXO: Publicaciones



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

- **Segarra-Mondejar, M.**, Casellas-Díaz, S., Ramiro-Pareta, M., Müller-Sánchez, C., Martorell-Riera, A., Hermelo, I., ... Soriano, F. X. (2018). Synaptic activity-induced glycolysis facilitates membrane lipid provision and neurite outgrowth. *The EMBO Journal*, 37(9), e97368.

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

- Martorell-Riera, A., **Segarra-Mondejar, M.**, Munoz, J. P., Ginet, V., Olloquequi, J., Perez-Clausell, J., ... Soriano, F. X. (2014). Mfn2 downregulation in excitotoxicity causes mitochondrial dysfunction and delayed neuronal death. *The EMBO Journal*, 33(20), 2388–2407.
- Martorell-Riera, Alejandro, **Segarra-Mondejar, M.**, Reina, M., Martínez-Estrada, O. M., & Soriano, F. X. (2015). Mitochondrial fragmentation in excitotoxicity requires rock activation. *Cell Cycle*, 14(9), 1365–1369.
- Velecela, V., Torres-Cano, A., García-Melero, A., Ramiro-Pareta, M., Müller-Sánchez, C., **Segarra-Mondéjar, M.**, ... Martínez-Estrada, O. M. Epicardial cell shape and maturation are regulated by Wt1 via the transcriptional control of the Bmp4 gene. *Development*. *Aceptado*.

Synaptic activity-induced glycolysis facilitates membrane lipid provision and neurite outgrowth

Marc Segarra-Mondejar^{1,2}, Sergi Casellas-Díaz^{1,2} , Marina Ramiro-Pareta^{1,3},
Claudia Müller-Sánchez¹, Alejandro Martorell-Riera^{1,†}, Ismaïl Hermelo^{1,‡}, Manuel Reina¹,
Julián Aragonés^{4,5}, Ofelia M Martínez-Estrada^{1,3} & Francesc X Soriano^{1,2,*} 

Abstract

The formation of neurites is an important process affecting the cognitive abilities of an organism. Neurite growth requires the addition of new membranes, but the metabolic remodeling necessary to supply lipids for membrane expansion is poorly understood. Here, we show that synaptic activity, one of the most important inducers of neurite growth, transcriptionally regulates the expression of neuronal glucose transporter Glut3 and rate-limiting enzymes of glycolysis, resulting in enhanced glucose uptake and metabolism that is partly used for lipid synthesis. Mechanistically, CREB regulates the expression of Glut3 and Siah2, the latter and LDH activity promoting the normoxic stabilization of HIF-1 α that regulates the expression of rate-limiting genes of glycolysis. The expression of dominant-negative HIF-1 α or Glut3 knockdown blocks activity-dependent neurite growth *in vitro* while pharmacological inhibition of the glycolysis and specific ablation of HIF-1 α in early postnatal mice impairs the neurite architecture. These results suggest that the manipulation of neuronal glucose metabolism could be used to treat some brain developmental disorders.

Keywords glycolysis; HIF-1 α ; neurite growth; Siah2; synaptic activity-mediated transcription

Subject Categories Metabolism; Neuroscience

DOI 10.15252/emboj.201797368 | Received 17 May 2017 | Revised 21 February 2018 | Accepted 5 March 2018 | Published online 3 April 2018

The EMBO Journal (2018) 37: e97368

Introduction

Early postnatal brain development is characterized by the massive outgrowth of dendrites and axons (Wong & Ghosh, 2002; Silbereis John *et al.*, 2016). Among the different mechanisms affecting dendritic development, signaling from afferents is particularly

important for dendritic growth (Rajan & Cline, 1998; Groc *et al.*, 2002; Wong & Ghosh, 2002; Konur & Ghosh, 2005). The most active phase of dendritic growth in the rat cerebral cortex is concurrent with the time of afferent innervations (Wong & Ghosh, 2002; Konur & Ghosh, 2005). Moreover, blocking neuronal activity *in vivo* alters dendritic development (Rajan & Cline, 1998; Groc *et al.*, 2002), while increased neuronal activity by exposure to an enriched environment positively influences dendritic growth (Faherty *et al.*, 2003).

Activity-mediated calcium influx activates signaling events that influence dendritic architecture, modifying cytoskeleton and activating transcriptional programs (Wong & Ghosh, 2002; Puram & Bonni, 2013). Several transcription factors and co-activators have been described to promote dendritic growth (Puram & Bonni, 2013), such as CREB, a transcription factor strongly activated by synaptic activity. In addition to its roles in cell survival and synaptic function, CREB is one of the most important transcription factors mediating activity-dependent dendritic morphogenesis in mammalian brain neurons (Lonze & Ginty, 2002; Puram & Bonni, 2013). Activation of CREB in cortical neurons induces dendritic growth and arborization, with dominant-negative CREB suppressing activity-dependent neurite growth (Redmond *et al.*, 2002). Furthermore, CREB knock-out mice show impaired axonal growth and projections (Lonze *et al.*, 2002). Despite the well-known function of CREB in regulating dendritic development, its target genes are not yet completely known.

Neurite growth requires cytoskeletal reorganization and cell membrane extension. The latter requiring a supply of lipids. Given the impermeable nature of the blood–brain barrier (BBB), most plasma lipoproteins cannot cross the BBB and lipids need to be synthesized in the brain. Studies investigating the incorporation of radiolabeled glycerol into lipids and their transport indicate that the bulk of lipid synthesis occurs in the cell body of neurons, with the lipids then exported in vesicles to the axon and dendrites for membrane expansion (Goldberg, 2003; Pfenninger, 2009). However, little is known on where the precursors necessary for

1 Celltec-UB, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

2 Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

3 Institute of Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

4 Research Unit, Hospital of La Princesa, Research Institute Princesa, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

5 CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, Carlos III Health Institute, Madrid, Spain

*Corresponding author. Tel: +34 93 402 15 35; E-mail: f.x.soriano@ub.edu

†Present address: Department of Biological Chemistry, David Geffen School of Medicine at University of California Los Angeles, Los Angeles, CA, USA

‡Present address: BioMediTech, University of Tampere, Tampere, Finland

lipid synthesis come from. The intermediates of glycolysis serve as lipid precursors (Vander Heiden *et al*, 2009). Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) is converted by glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1) into glycerol-3-phosphate, which is then used for synthesizing glycerol-backbone lipids. Pyruvate, the end product of glycolysis, is transported to the mitochondria where it enters the tricarboxylic acid (TCA) cycle as citrate and is further metabolized or exported to the cytoplasm to be broken down by ATP-citrate lyase (ACLY) into oxaloacetate and acetyl-CoA, which serves as a precursor in lipid biosynthesis. Meta-analysis of brain and glucose consumption demonstrates that aerobic glycolysis increases in the human brain when synaptic growth rates are highest, suggesting that glycolysis provides biosynthetic support for neurite growth (Goyal Manu *et al*, 2014). However, it is unclear whether glycolysis is regulated by neuritogenic cues or is needed for neurite growth.

Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is a transcription factor regulating adaptive responses to hypoxia. It occurs as heterodimer composed of an unstable HIF-1 α and a stable HIF-1 β (also known as ARNT). The heterodimer binds hypoxia response elements (HRE) on target genes, which includes those associated with glucose transport and glycolysis genes, among others (Semenza *et al*, 1994; Denko, 2008). Normally, HIF-1 α is ubiquitinated and degraded in normoxic conditions. Hydroxylation of Pro-402 and Pro-564 by prolyl hydroxylases (PHD) in the oxygen-dependent degradation domain (ODD) of human HIF-1 α promotes interaction with the von Hippel–Lindau ubiquitin ligase complex (VHL) which targets HIF-1 α for proteolysis (Maxwell *et al*, 1999; Ivan *et al*, 2001; Jaakkola *et al*, 2001). Another regulatory element of the PHD/VHL pathway is the E3 ubiquitin ligase Siah2, which contributes to HIF-1 α stabilization (Nakayama *et al*, 2004; Li *et al*, 2017). Despite its generally short half-life in normoxia, HIF-1 α can be stabilized in normoxia by growth factors, metabolite accumulation, the expression of oncogenes, or ROS production (Denko, 2008).

Although much is known on the molecular mechanisms mediating cytoskeletal remodeling and lipid transport to induce neurite growth, little is known about the metabolic adaptations required for neuronal membrane extension. Here, we show CREB activation by synaptic activity induces the expression of the glucose transporter Glut3 and promotes Siah2-mediated stabilization of HIF-1 α that upregulates the expression of glycolysis genes. As a consequence, glucose metabolism is enhanced and part of it is used to provide the lipid precursors necessary for neurite growth.

Results

Glucose metabolism is necessary for activity-dependent neurite outgrowth

Neuronal activity promotes neurite growth which requires a supply of lipids to enlarge membranes. Accordingly, using an established method of network disinhibition to enhance synaptic activity by applying the GABAA receptor antagonist bicuculline (Bic) and the K⁺ channel antagonist 4-aminopyridine (4AP) (Hardingham *et al*, 2001), we observed that active neurons have increased levels of FASN and ACLY (Appendix Fig S1A–C), two key enzymes for the novo lipid synthesis.

Glucose-derived acetyl-CoA is the main precursor for lipid biosynthesis (Pietrocola *et al*, 2015; Divakaruni *et al*, 2017). Thus, it was analyzed incorporation of radioactively labeled glucose into lipids in neurons that have experienced an episode of synaptic activity. After 48 h of stimulation, active neurons showed increased glucose incorporation into lipids (Fig 1A). This was impaired by knockdown of the glycolytic enzyme GPI (Fig 1B and Appendix Fig S1D). Glutamine metabolism is another major source of lipogenic acetyl-CoA (Pietrocola *et al*, 2015); however, synaptic activity did not increase glutamine incorporation into lipids (Appendix Fig S1E).

One molecule of glucose is converted to two molecules of pyruvate during glycolysis. Pyruvate enters the mitochondria, where it is decarboxylated to produce acetyl-CoA that then conjugates with oxaloacetate to produce citrate. Citrate can be further metabolized in the TCA cycle or exported to the cytoplasm, where it is converted into acetyl-CoA by ACLY to be used for fatty acid synthesis. Total and cytosolic acetyl-CoA levels were also increased in active neurons (Fig 1C and D), but not CoA levels (Appendix Fig S1F), which was not observed when glycolysis was inhibited with 2-deoxy-D-glucose (Fig 1E), indicating a major role of glucose as a source of the increased amounts of acetyl-CoA. In agreement, knockdown of ACLY blocked activity-dependent enhanced glucose incorporation into lipids (Fig 1F, and Appendix Fig S1G and H).

In accordance with the need of glucose-derived lipid production to enlarge membranes for neurite growth, knockdown of Glut3 (Fig 1G and H), the main glucose transporter in neurons, inhibition of glucose metabolism with 2-DG (Appendix Fig S1I), or knockdown of ACLY (Appendix Fig S1J) abolished activity-mediated neurite growth which at this developmental stage represents axonal growth.

Synaptic activity stimulates neuronal glucose uptake and metabolism at the transcriptional level

To investigate whether increased acetyl-CoA levels correlated with increased glucose uptake and metabolism, neurons were stimulated for 24 h with Bic+4AP and washed for 30 min to allow restoration of ion gradients before analyzing glucose uptake. Bic+4AP washing effectively blocked burst firing (Appendix Fig S2A and B). It was found that neurons that had experienced synaptic activity increased their glucose uptake (Fig 2A and Appendix Fig S2C). Glycolysis-produced pyruvate is partially metabolized into lactate in a reaction that regenerates NAD⁺ that is necessary for glycolysis to continue. Glycolysis is the main source of lactate, accounting for 82–90% on different types of cells (Zhang *et al*, 2017). Thus, lactate release into the medium is a commonly used surrogate of glycolytic flux (TeSlaa & Teitell, 2014). Active neurons released 75% more lactate than resting ones (Fig 2B). This was not due to the hyperglycemic medium used in this study, since culturing the neurons with physiological glucose concentration in rat brain (2.4 mM; Silver & Erecinska, 1994) produced similar lactate release (Appendix Fig S2D). In another approach to demonstrate increased glycolysis in active neurons, neurons were stimulated for 24 h and washed for 30 min, to allow restoration of ionic gradients, before uncoupling the mitochondria with CCCP for 30 min. This drastically reduced ATP levels, which were less reduced in the stimulated neurons than unstimulated ones, but only when glucose was present in the medium (Fig 2C), indicating that the increased glycolysis in active neurons

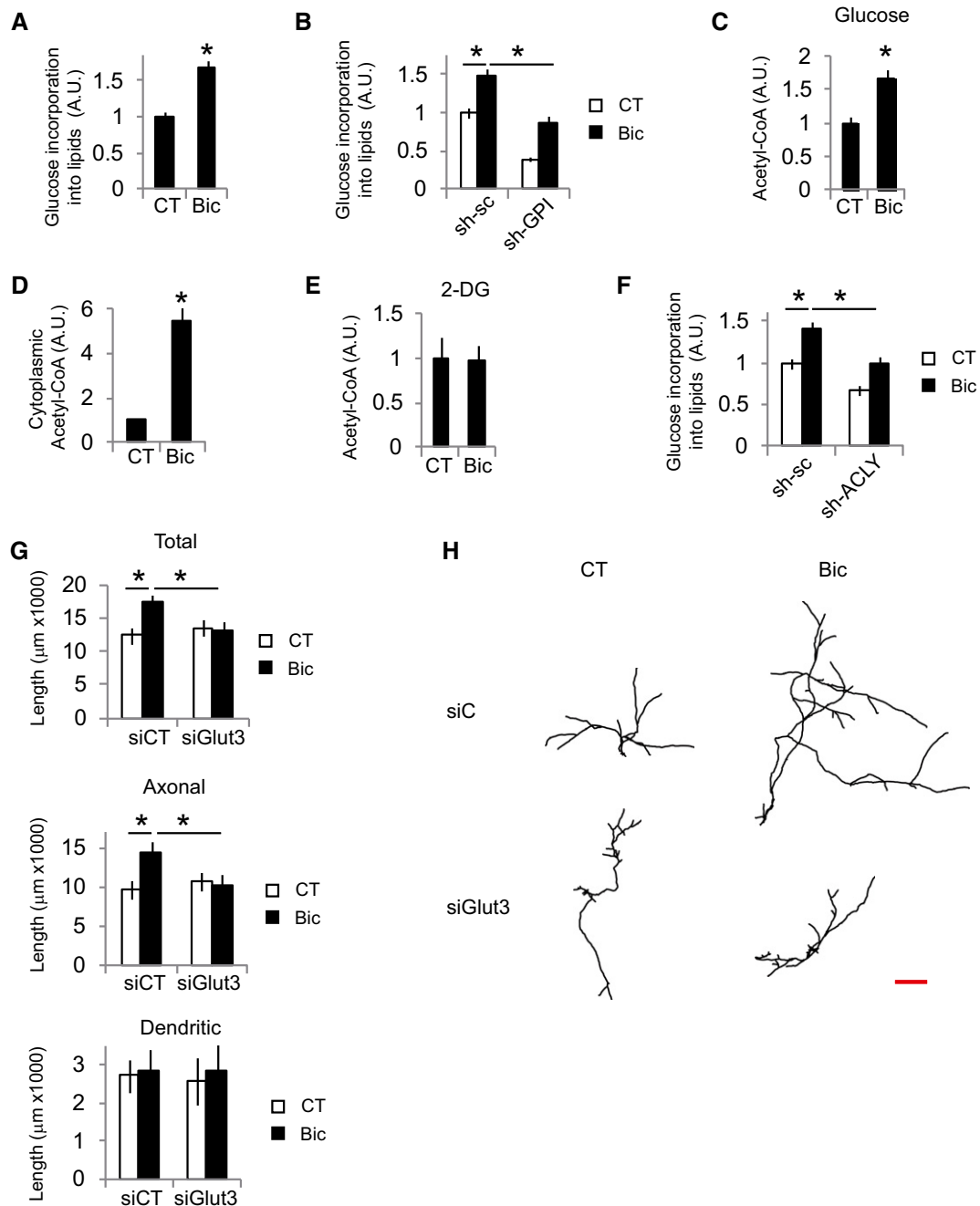


Figure 1. Glucose uptake is necessary for activity-dependent neurite outgrowth.

A, B Untransduced (A) or AAV-shGPI or AAV-sh-sc (control) transduced neurons (B) were incubated with ^{14}C -U-glucose and were stimulated with bicuculline plus 4-AP (labeled Bic in this and subsequent figures) for 48 h or left unstimulated (CT). Cellular lipids were extracted and radioactive counts measured ($n = 4\text{--}7$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test (A) and ANOVA one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test (B).

C Cortical neurons were stimulated for 24 h with Bic+4-AP in the presence of glucose ($n = 8$ independent experiments). After 24 h, total acetyl-CoA levels were assayed. Values represent mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test.

D Determination of cytosolic acetyl-CoA levels after 24 h of Bic+4-AP stimulation in the presence of glucose ($n = 4$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test.

E Acetyl-CoA levels in cortical neurons stimulated for 24 h with Bic+4-AP in the presence of 25 mM of the non-metabolizable glucose analog 2-DG ($n = 4$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m.

F ^{14}C -U-glucose incorporation into lipids in neurons transduced with AAV expressing shRNA-sc or targeting ACly (sh-ACly) after 48 h stimulation with Bic+4-AP ($n = 7$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

G, H Neurite length and representative tracings of the neuritic tree of control and Bic+4-AP-stimulated neurons (for 48 h) after transfection with non-targeting (siCT) or Glut3-targeting (siGlut3) siRNAs ($n = 45\text{--}49$ neurons from nine independent experiments). Scale bar, 500 μm . Values represent mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

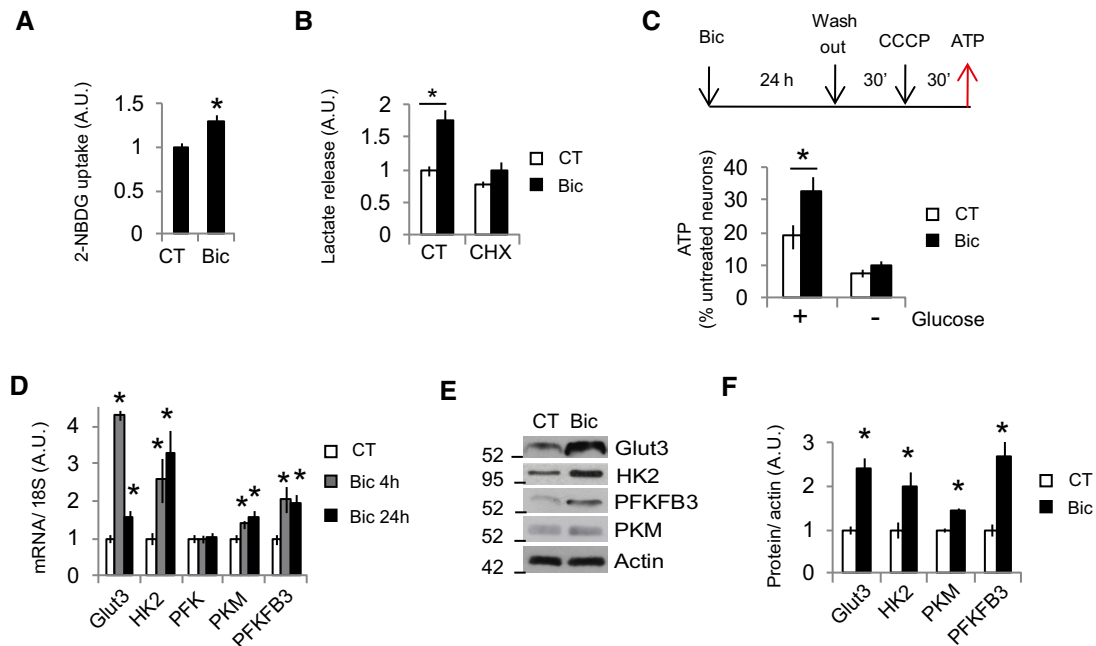


Figure 2. Synaptic activity stimulates neuronal glucose uptake and metabolism at the transcriptional level.

- A 2-NBDG uptake over 15 min in control or Bic+4-AP-stimulated (for 24 h) neurons after washing and medium replacement ($n = 4$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, two-tailed Student's t -test.
- B Neurons treated or not with cycloheximide (10 μ M) were stimulated with Bic+4-AP (for 24 h) before measuring the amount of lactate released into the medium ($n = 4$ –7 independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, two-tailed Student's t -test.
- C ATP levels in unstimulated neurons that were treated with CCCP (3 nM) following the indicated chronogram. + or – glucose indicates whether the fresh medium added after the wash step contained glucose or not ($n = 3$ –6 independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, two-tailed Student's t -test.
- D Cortical neurons were stimulated with Bic+4-AP for 4 or 24 h, and mRNA expression of the indicated genes was determined by real-time qPCR ($n = 3$ –6 independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, two-tailed Student's t -test.
- E, F (E) Representative Western blot and (F) densitometric analysis of protein samples from control and Bic+4-AP-stimulated (24 h; $n = 3$ –4 independent experiments). $*P < 0.05$, two-tailed Student's t -test.

Source data are available online for this figure.

can supply more ATP than in resting ones when the mitochondria are not functional.

Synaptic activity has been shown to mediate Glut3 translocation to the membrane (Ferreira *et al*, 2011). Moreover, synaptic activity is a potent regulator of gene expression programs (Greer & Greenberg, 2008; Bading, 2013). Thus, we aimed to determine whether activity-mediated glycolysis induction was mediated at the transcriptional or posttranslational level. Cycloheximide was used to inhibit mRNA translation. If glucose metabolism induction was mainly due to posttranslational modifications, the increase in glucose metabolism would not be affected by cycloheximide treatment; it would be affected by cycloheximide if *de novo* protein synthesis was involved. We found that cycloheximide abolished the glucose metabolism induced by synaptic activity, which was established by measuring lactate release (Fig 2B). This was not the consequence of reduced neuronal viability since cycloheximide treatment did not affect viability (Appendix Fig S2E). Next, we used qPCR to analyze the expression of Glut3, the main glucose transporter in neurons; HK2, PFK, and PKM, the three regulating enzymes of the glycolysis; and PFKFB3, which produces fructose-2,6-bisphosphate, a potent allosteric activator of PFK. There was an increase in the expression of all these genes except PFK (Fig 2D). Strikingly, Glut3 showed a different expression pattern to these associated with

glycolysis. Along with the increased mRNA levels, synaptic activity induced the protein expression of these genes (Fig 2E and F). Interestingly, treatment of neurons with BDNF, a neurotrophic factor that induces neurite growth (Park & Poo, 2013), also induced the expression of glucose metabolism genes, as well as increased glucose uptake and lactate release (Appendix Fig S2F–H), although it cannot be excluded an indirect effect due to BDNF-induced enhanced neuronal activity (Li *et al*, 1998).

Glial and neuronal metabolism is coupled (Bélanger *et al*, 2011). Around 2% of our primary cortical neuron cultures were glial cells (Appendix Fig S2I and J). Neuronal glucose uptake experiments were analyzed by cell imaging, but the lactate release and ATP production experiments were performed using the mixed cultures. Thus, we could not rule out the possibility that activity-dependent enhanced glycolysis occurred in the glial cells rather than neurons. To clarify this, we used two approaches. The mitosis inhibitor AraC is used in our cortical cultures to block glial proliferation. In a first approach, we prepared parallel cortical cultures that were treated with AraC or not to obtain cultures with different proportions of glial cells (Appendix Fig S2I and J). If the stimulation-mediated increase in lactate release was due to changes in gene expression in glial cells rather than neurons, modifying the abundance of glial cells in the co-culture would elicit a corresponding increase in

lactate release after stimulation. Although cultures not treated with AraC had around tenfold more astrocytes than AraC-treated ones, these two types of cultures showed the same degree of lactate release when stimulated, confirming that the enhanced glucose metabolism and, consequently, the expression of glucose metabolism genes when stimulated occurred in neurons rather than astrocytes (Appendix Fig S2K). In the second approach, we used pure astrocyte cultures. Astrocytes express functional BDNF receptors (Rose et al, 2003; Ohira et al, 2005); however, BDNF did not increase lactate release in pure astrocyte cultures like it did in neuronal cultures (Appendix Fig S2H and L). Thus, enhancement of glucose metabolism takes place in neurons when stimulated with neurite growth inducers.

Activity-dependent induction of glycolysis genes depends on HIF-1 α stabilization

Next, we investigated the transcription factor responsible for the induction of activity-mediated glucose metabolism genes. HIF-1 α is

a transcription factor that stimulates glycolysis by transactivating the genes involved in intracellular glucose transport and glycolysis (Semenza et al, 1994; Denko, 2008). Although HIF-1 α is typically unstable in normoxia, certain conditions enable its stabilization in normoxic conditions (Denko, 2008). Thus, HIF-1 α could be responsible for inducing glucose metabolism genes. We observed HIF-1 α stabilization in active and BDNF-treated neurons (Figs 3A and B, and EV1A–C), but not HIF-2 α (Fig EV1E and F), that correlated with increased HIF-1 α transcriptional activation (Fig 3C). Overexpression of HIF-DN, a dominant-negative form of HIF-1 α (HIF-DN) formed by the DNA binding domain of HIF-1 α and lacking the prolyl hydroxylase and transactivation regions, completely blocked activity-mediated transcriptional activation of HIF-1 α (Fig 3C). Transduction with AAV-HIF-DN blocked activity-dependent induction of glycolysis genes, but had no effect on Glut3 gene expression (Fig 3D). This was not completely surprising because the pattern of Glut3 expression was different to that of the glycolysis genes (Fig 2D). All together, these results indicate that the activity-dependent induction of glycolysis genes depends on HIF-1 α . Consequently, the

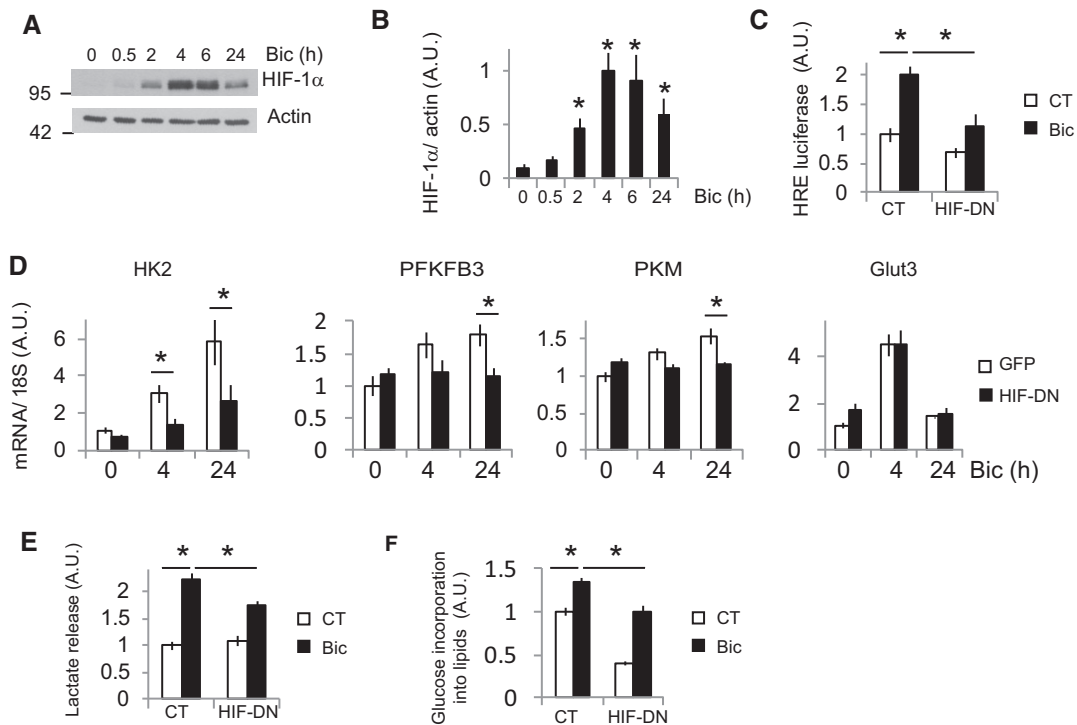


Figure 3. Activity-dependent induction of glycolysis genes depends on HIF-1 α stabilization.

- A Cortical neurons were stimulated with Bic+4-AP over various time points, and the HIF-1 α protein was analyzed by Western blotting ($n = 5$ independent experiments).
- B Densitometric analysis of HIF-1 α expression in (A). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, two-tailed Student's t -test.
- C Luciferase-based HIF-1 α activity in neurons expressing a control plasmid (globin) or a dominant-negative HIF-1 α (HIF-DN) and stimulated with Bic+4-AP for 8 h ($n = 4$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.
- D Cortical neurons were transduced with AAV expressing HIF-DN or control (GFP), stimulated for 4 or 24 h with Bic+4-AP, and the mRNA expression of the indicated genes was analyzed by qPCR ($n = 5$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.
- E Lactate released into the medium by neurons transduced with AAV expressing HIF-DN or control (GFP) after 24 h stimulation with Bic+4-AP ($n = 3$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.
- F ^{14}C -U-glucose incorporation into lipids in neurons transduced with AAV expressing HIF-DN or control (GFP) and stimulated for 48 h with Bic+4-AP ($n = 4$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

Source data are available online for this figure.

activity-mediated lactate release and glucose incorporation into lipids were reduced in HIF-DN expressing neurons (Fig 3E and F).

HIF-1 α is stabilized by Siah2 and LDH activity

HIF-1 α regulation is mainly mediated by proteasomal degradation in normoxia. Hydroxylation of prolynes in the ODD domain of HIF-1 α by PHDs promotes HIF-1 α proteolysis (Maxwell *et al*, 1999; Ivan *et al*, 2001; Jaakkola *et al*, 2001). We studied whether synaptic activity decreased PHD activity. Neurons were transfected with a plasmid expressing firefly luciferase fused to the oxygen-dependent degradation domain of HIF-1 α (ODD-Luc). Synaptic activity resulted in increased luciferase activity in ODD-Luc, but not wild-type firefly luciferase (Luc)-transfected neurons (Fig 4A and B), indicating reduction in PHD activity. Siah2 is an E3 ubiquitin ligase that promotes HIF-1 α stabilization mainly by mediating proteasomal degradation of PHDs (Nakayama *et al*, 2004), although other mechanisms by which Siah2 promotes HIF-1 α stabilization have been also described (Li *et al*, 2017). Siah2 mRNA and protein levels were induced by synaptic activity (Fig 4C–E) and BDNF (Fig EV1B and D, and Appendix Fig S3B), correlating with reduced PHD activity. However, Siah1 is downregulated by synaptic activity (Appendix Fig S3A). To confirm the role of Siah2 in activity-dependent HIF-1 α stabilization, we knocked down (KD) Siah2 by transducing the neurons with two AAV expressing different shRNAs targeting Siah2. Siah2 KD neurons showed a strong reduction of activity-dependent HIF-1 α accumulation (Fig 4F–H and Appendix Fig S3C–G). Next, we checked the expression levels of PHD in active neurons and surprisingly we observed no changes in PHD1, PHD3, and FIH, and increased expression of PHD2 (Appendix Fig S3H and I). One alternative mechanism by which Siah2 could stabilize HIF-1 α is mediating degradation of the enzymes of the OGDHC, OGDH, and DLST (Sun Ramon & Denko Nicholas, 2014; Burr Stephen *et al*, 2016; Nadochiy *et al*, 2016; Intlekofer *et al*, 2017), but we could not observe changes in protein levels of these enzymes (Appendix Fig S3H and I). However, a central role of Siah2 upregulation in the activity-mediated enhanced glucose metabolism was further confirmed by showing that Siah2 KD blocked activity-mediated lactate release (Fig 4I) and glucose incorporation into lipids (Fig 4J).

HIF-1 α regulation is complex, with several regulators and mechanisms being involved. We tested whether other mechanisms different from the one mediated by Siah2 induction could participate as well in activity-mediated HIF-1 α stabilization. HIF-1 α is an O₂-sensitive transcription factor that mediates the primary response to hypoxic stress. Excessive O₂ consumption in active neurons could generate transitory hypoxia that mediates HIF-1 α stabilization. However, the use of a hypoxia sensor probe did not show hypoxia generation by synaptic activity (Appendix Fig S3J). Synaptic activity regulates a transcriptional program of defense against oxidative stress (Papadia *et al*, 2008). However, acute synaptic activity could boost mitochondrial metabolism and enhance ROS production which is involved in HIF-1 α stabilization in normoxia; therefore, we tested whether the use of antioxidants could block HIF-1 α activation by synaptic activity, but it did not have any effect on activity-mediated HIF-1 α stabilization (Appendix Fig S3K and L). Increased HIF-1 α levels in active neurons were not due to the transcriptional regulation of HIF-1 α either (Appendix Fig S3M). Both rise in pyruvate level and rise in lactate level stabilize HIF-1 α (Lu *et al*, 2002).

We inhibited LDH with oxamate, which produces accumulation of pyruvate and reduces lactate release (Lu *et al*, 2002). Oxamate treatment blocked activity-mediated HIF-1 α stabilization (Fig 4K and L). Since, both, Siah2 KD and LDH inhibition almost completely blocked activity-mediated HIF-1 α stabilization, they may be part of the same regulatory pathway.

Glut3 and Siah2 expressions are regulated by CREB

Since Glut3 expression in active neurons did not depend on HIF-1 α activation, we explored which transcription factor could regulate it. CREB is a powerful regulator of synaptic activity-mediated gene expression (Greer & Greenberg, 2008; Bading, 2013), controls neurite outgrowth (Redmond *et al*, 2002), and is involved in metabolic regulation in different cell types (Altarejos & Montminy, 2011). CREB has been shown to regulate Glut3 expression (Rajakumar *et al*, 2004); thus, we tested whether CREB was involved in activity-mediated Glut3 expression. Transduction of neurons with AAV expressing a dominant-negative CREB (A-CREB; Ahn *et al*, 1998) blocked activity-dependent Glut3 expression (Fig 5A).

Given that Glut3 and Siah2 showed a similar pattern of mRNA expression following synaptic activity, a high activation after 4 h with the decay at 24 h (Figs 2D and 4C), we assessed whether Siah2 was also regulated by CREB. A-CREB blocked Siah2 induction (Fig 5B–D) and, consequently, blocked the HIF-1 α stabilization induced by synaptic activity (Fig 5C and E). Furthermore, overexpression of the endogenous CREB inhibitor ICER (Molina *et al*, 1993) also blocked HIF-1 α activity (Fig 5F) but did not disturb the activity of MEF2 (Fig EV2A), an activity-dependent transcription factor (Greer & Greenberg, 2008). Forskolin, an adenylyl cyclase activator and hence CREB activator, was sufficient to induce Siah2 expression and HIF-1 α stabilization and activation (Fig 5G–J). In agreement with an indirect CREB-dependent activation of HIF-1 α via increased Siah2 expression, we observed that CREB activation preceded HIF-1 α activation (Fig 5K).

As expected, A-CREB expression blocked activity-dependent lactate release (Fig 5L) and glucose incorporation into lipids (Fig 5M). Forskolin also stimulated lactate release (Fig EV2B) but had no effect on glucose incorporation into lipids (Fig EV2C), in agreement with the fact that cAMP greatly potentiates neuritic growth in response to neurotrophic factors but does not promote growth by its own (Goldberg *et al*, 2002).

Defective glycolysis impairs neurite growth

This and the previous results suggest that Siah2 and HIF-1 α may be necessary for neurite growth through regulating glycolysis. Indeed, HIF-1 α or Siah2 overexpression in DIV 3 immature cortical neurons increased neurite length (Fig 6A–C) that at this stage represents axonal growth (Dotti *et al*, 1988). However, HIF-DN expression or Siah2 knockdown blocked activity-dependent neurite growth in DIV 10 cortical neurons (Fig 6D–G).

The first 3 weeks after birth is when maximum neurite growth occurs in mice, being synaptic activity one of the effectors of this growth (Wong & Ghosh, 2002). In order to provide evidence about the *in vivo* role of glucose metabolism on neurite growth, we administered PFKFB3 inhibitor 3PO (Schoors *et al*, 2014) for 5 days to rat pups that were 8 days old. Golgi staining showed reduced

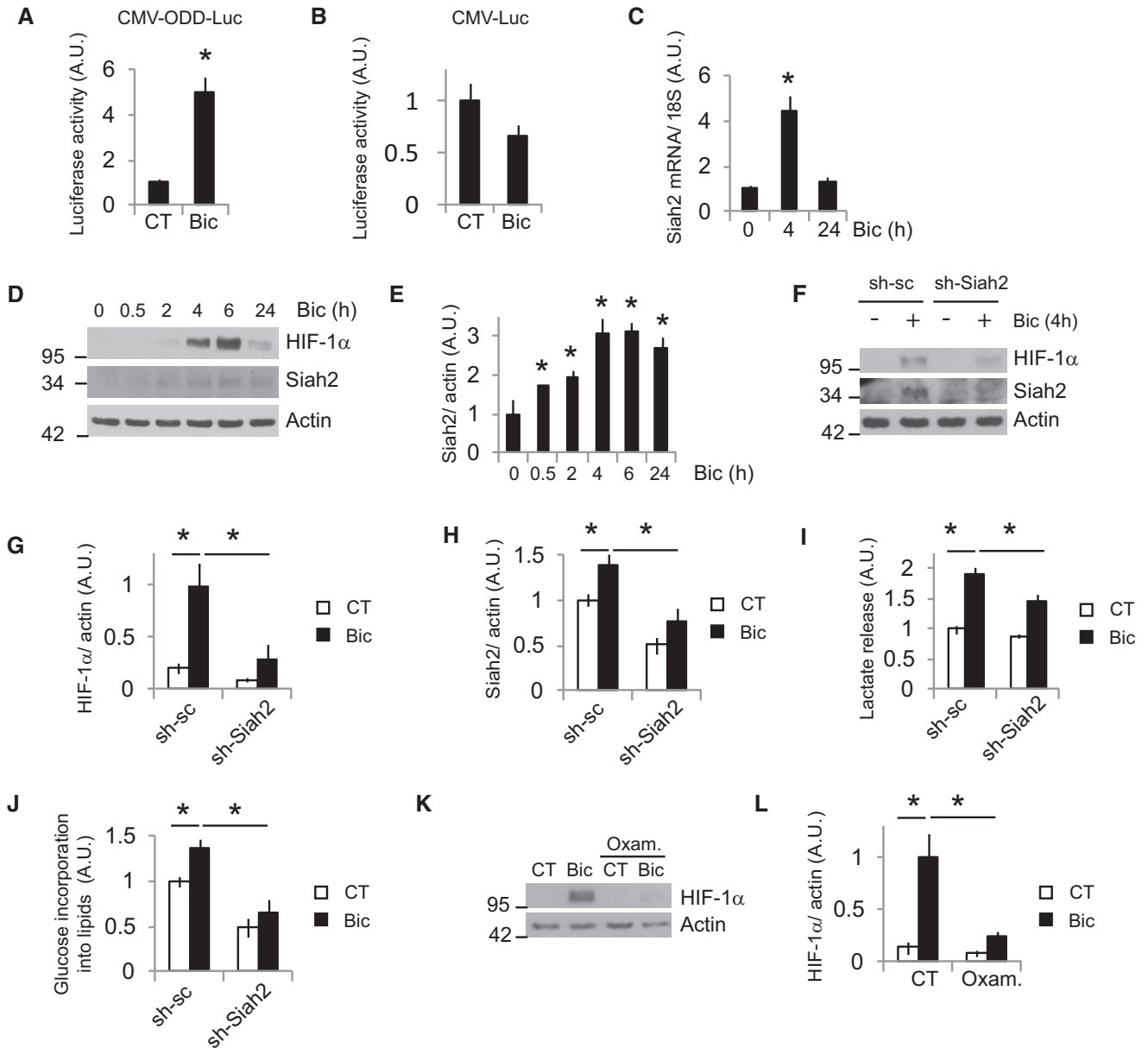


Figure 4. HIF-1α is stabilized by Siah2 and LDH activities.

A, B PHD activity after Bic+4-AP stimulation was assayed measuring luciferase activity in neurons transfected with plasmids expressing luciferase fused to the ODD domain of HIF-1α. Non-fused luciferase was used as control ($n = 4$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, two-tailed Student's t -test.

C Cortical neurons were stimulated with Bic+4-AP for 4 or 24 h, and Siah2 mRNA expression was determined by real-time qPCR ($n = 4$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, two-tailed Student's t -test.

D Cortical neurons were stimulated with Bic+4-AP over various time points, and the indicated proteins were analyzed by Western blotting ($n = 3$ –5 independent experiments).

E Densitometric analysis of Siah2 protein levels in (D). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, two-tailed Student's t -test.

F AAV-sh-sc (control) or sh-Siah2 transduced neurons were stimulated with Bic+4-AP for 4 h before analyzing the expression of the indicated proteins ($n = 5$ independent experiments).

G, H Densitometric analysis of the indicated proteins in (F). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

I Lactate released into the medium by neurons transduced with AAV expressing shRNA-sc or targeting Siah2 (sh-Siah2) after 24-h stimulation with Bic+4-AP ($n = 4$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

J ^{14}C -U-glucose incorporation into lipids in neurons transduced with AAV expressing shRNA-sc or targeting Siah2 (sh-Siah2) after 48 h stimulation with Bic+4-AP ($n = 7$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

K, L (K) Representative Western blot and (L) densitometric analysis of neurons stimulated for 4 h with Bic+4-AP in absence or presence of 40 mM oxamate (Oxam.; $n = 5$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test.

Source data are available online for this figure.

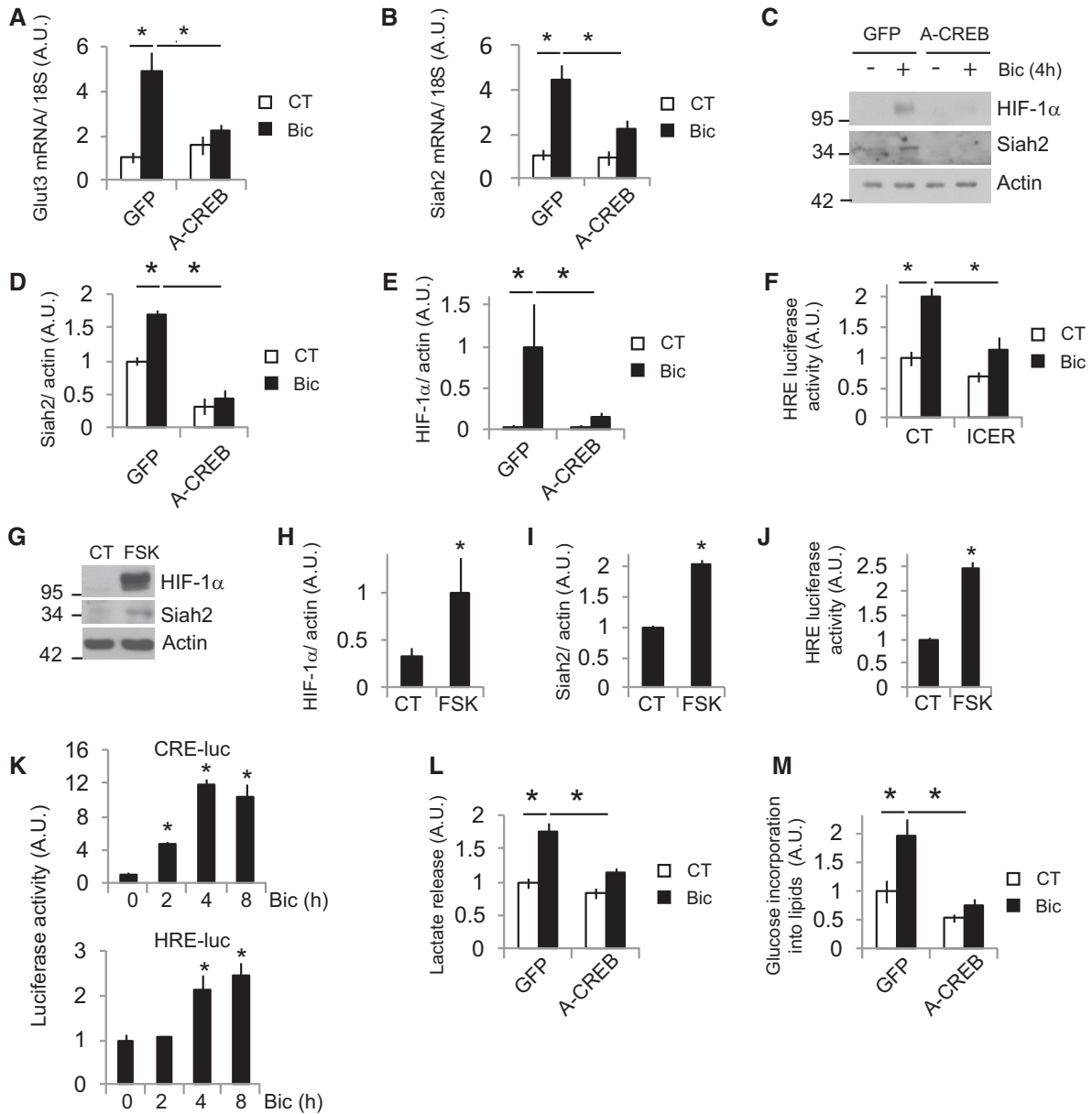


Figure 5. Glut3 and Siah2 expressions are regulated by CREB.

A, B Cortical neurons transduced with AAV expressing GFP (control) or dominant-negative A-CREB were stimulated with Bic+4-AP for 4 h before analyzing the mRNA expression of (A) Glut3 and (B) Siah2 by qPCR ($n = 5$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

C–E (C) Representative Western blot and (D and E) densitometric analyses of the indicated proteins of neurons transduced with AAV expressing GFP or A-CREB and stimulated with Bic+4-AP for 4 h ($n = 3$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

F Luciferase-based HIF-1 α activity in neurons expressing a control plasmid (globin) or a CREB inhibitor ICER and stimulated with Bic+4-AP for 8 h ($n = 5$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

G–I CREB activator forskolin (FSK) was sufficient to induce Siah2 expression and stabilize HIF-1 α . (G) Representative Western blot and (H and I) densitometric analysis of neurons treated with 10 μ M forskolin for 4 h ($n = 3$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test.

J Luciferase-based HIF-1 α activity in neurons treated with forskolin for 8 h ($n = 4$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test.

K CREB activation temporally precedes HIF-1 α activation. Luciferase-based CREB and HIF-1 α activity at different time points after Bic+4-AP stimulation ($n = 4$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test.

L Lactate released into the medium by neurons transduced with AAV expressing A-CREB or control (GFP) after 24 h stimulation with Bic+4-AP ($n = 5$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

M 14 C-U-glucose incorporation into lipids in neurons transduced with AAV expressing A-CREB or control (GFP) and stimulated for 48 h with Bic+4-AP ($n = 5$ independent experiments). Values represent mean \pm s.e.m. $*P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

Source data are available online for this figure.

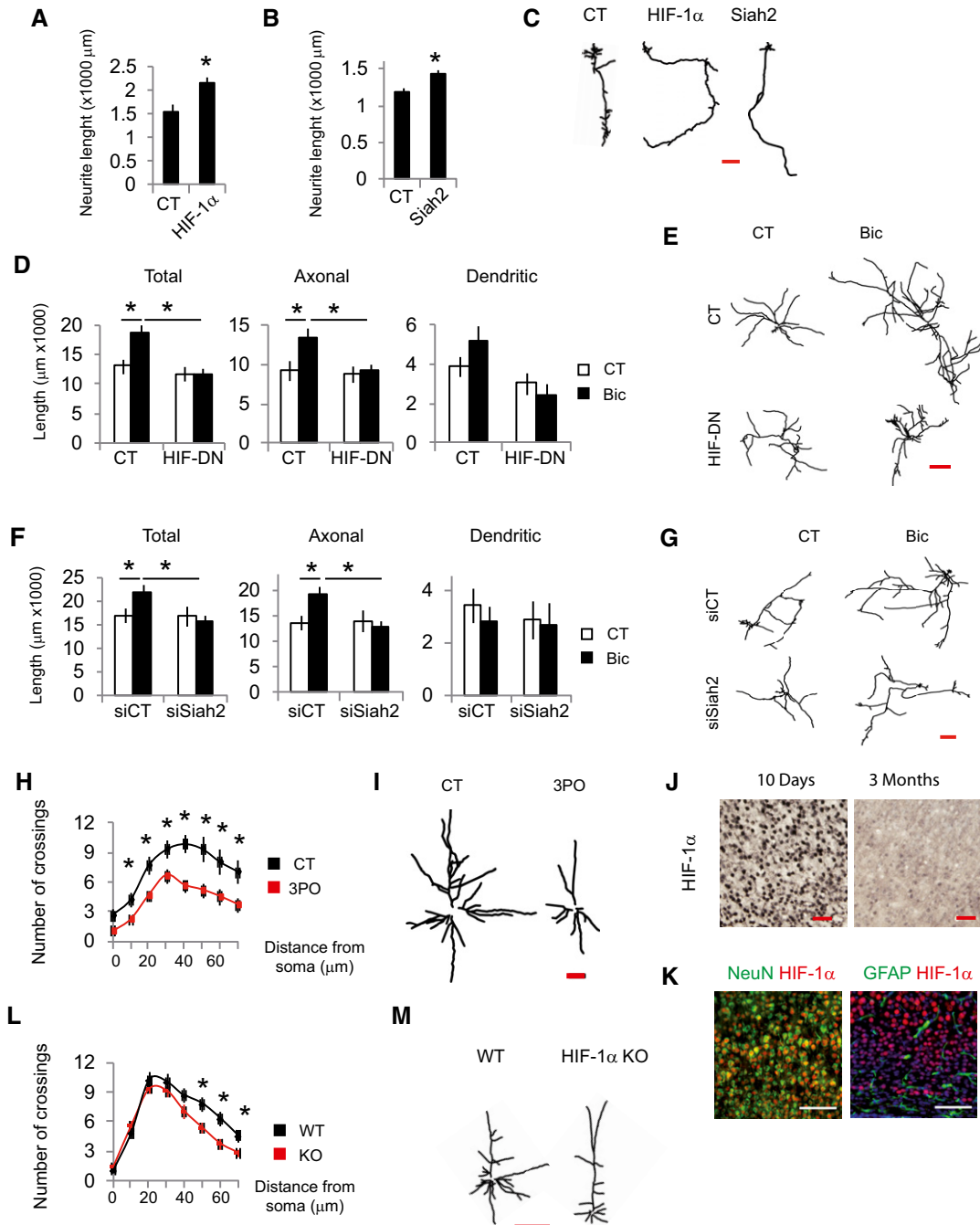


Figure 6. Defective glycolysis impairs neurite growth.

A–C Analysis of neurite length of immature neurons transfected at DIV1 with GFP-expressing plasmids plus control plasmids (globin) or expressing HIF-1α (A), Siah2 (B) and analyzed 48 h after transfection and (C) representative tracings ($n = 27\text{--}40$ neurons from six independent experiments). Scale bar, 100 μm. Values represent mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test.

D–G Analysis of neurite length and representative tracings of neurons transfected at DIV8 with GFP expressing plus plasmids control (globin) or expressing HIF-DN (D and E) or a non-targeting siRNA (siCT) or a pool of four siRNAs targeting Siah2 (F and G) and stimulated the day after with Bic+4-AP for 48 h ($n = 27\text{--}36$ neurons from six independent experiments). Scale bar, 500 μm. Values represent mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

H, I (H) Sholl analysis and (I) representative tracings of Golgi-stained layer 5 pyramidal neurons of the somatosensory cortex of 14-day-old rats administered with 3PO (50 mg/kg) for 5 days ($n = 15\text{--}20$ neurons from four mice per condition). Scale bar, 100 μm. Values represent mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test.

J Immunohistochemical detection of HIF-1α in sections of the somatosensory cortex from 10-day and 3-month-old mice ($n = 3$ mice per condition). Scale bar, 50 μm.

K Immunofluorescence detection of HIF-1α, NeuN, and GFAP in cortical sections from 10-day-old mice ($n = 3$ mice per condition). Scale bar, 100 μm.

L, M (L) Sholl analysis and (M) representative tracings of Golgi-stained layer 5 pyramidal neurons of the somatosensory cortex of WT and early postnatal deleted HIF-1α mice ($n = 16$ neurons from three mice per condition). Scale bar, 100 μm. Values represent mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test.

complexity of neuritic arbors in the cortex of 3PO administered rats (Fig 6H and I).

HIF-1 α deletion in neural precursor cell progenitors leads to atrophy of the cerebral cortex, indicating an important role for HIF-1 α in neuronal development *in vivo* (Tomita *et al*, 2003). Thus, we compared HIF-1 α expression in the brains of mice that were 10 days and 3 months old. We observed a higher density of HIF-1 α -positive cells and increased protein levels in 10-day-old mice compared to 3-month-old mice (Figs 6J, and EV3A and B). Expression of HIF-1 α in 10-day-old mice brain was highest in the cortex, hippocampus, and corpus callosum (Fig EV3C). Dual staining revealed colocalization of HIF1 α with the neuronal marker NeuN and complete absence in astrocytes expressing GFAP (Fig 6K).

In order to provide evidence about the *in vivo* role of HIF-1 α in neurite growth, we deleted HIF-1 α in tamoxifen-inducible HIF-1 α KO mice that were 3–5 days old, when gross anatomy of the brain resembles to that of the adult but is characterized by outgrowth of dendrites and axons. Once these animals reached adulthood (4–6 months), the neuronal architecture of the cortex of WT and HIF-1 α KO mice was analyzed by Golgi staining, which showed reduced complexity of neuritic arbors in the KO mice (Fig 6L and M). Interestingly, glucose metabolism is necessary for axonal growth

in vitro with no effect on dendritic growth meanwhile *in vivo* the effect observed accounts mainly for dendritic growth. This is possibly due to the fact that in the developmental stage when neurites were analyzed *in vitro*, dendrites are mostly stable and axons are growing while postnatal dendrites are still growing *in vivo*. Taken together, our results indicate that induction of glucose metabolism in neurons is required for proper neuronal development regardless whether the neurons are in axonal or dendritic growth state.

Discussion

Signaling from afferents plays an essential role in neurite growth (Rajan & Cline, 1998; Groc *et al*, 2002; Wong & Ghosh, 2002). Here, we show that activity-dependent neurite growth requires induction of glucose metabolism. Synaptic activity enhances glucose uptake and metabolism, some of which is diverted toward lipid synthesis that is required for cell membrane enlargement during outgrowth. The induction of glucose metabolism is mediated at the transcriptional level, and CREB induces Glut3 and Siah2, the latter promoting the normoxic stabilization of HIF-1 α that regulates the expression of the rate-limiting enzymes involved in glycolysis (Fig 7A and B).

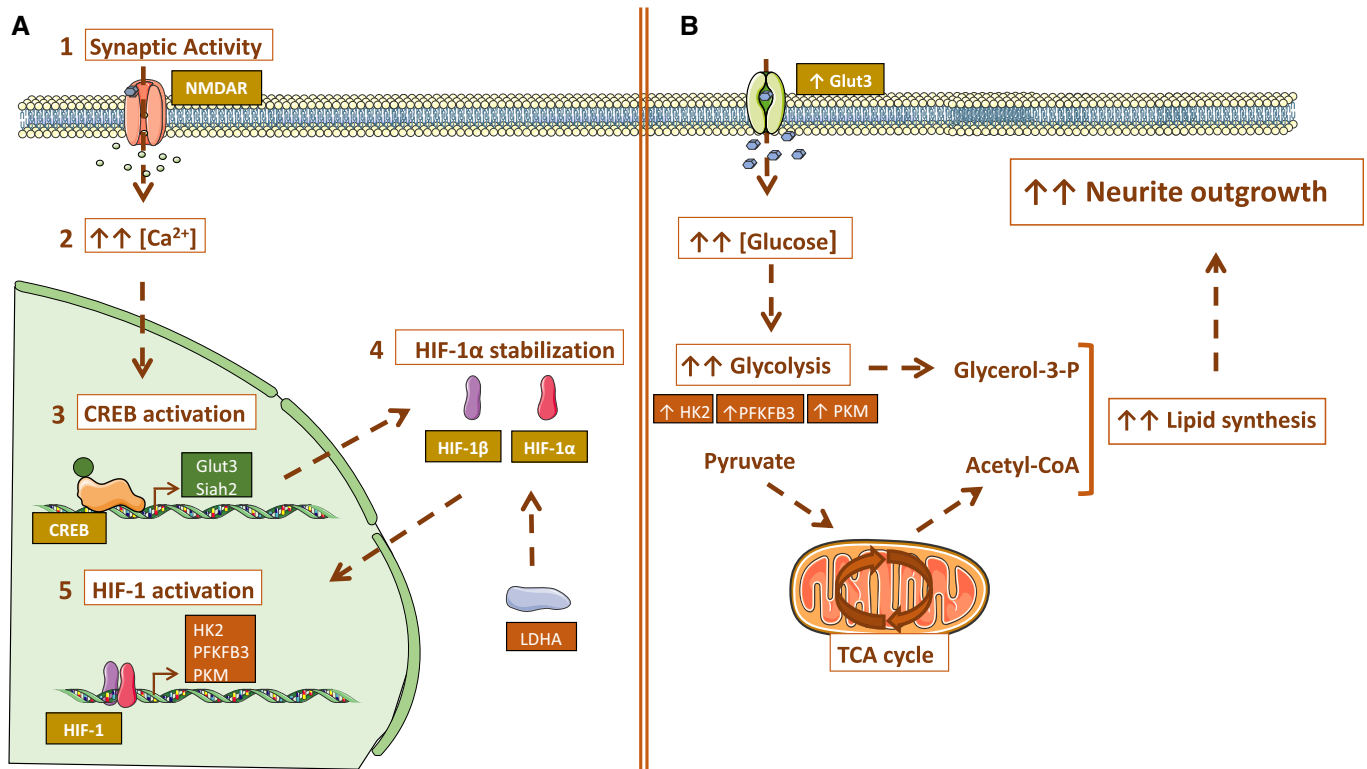


Figure 7. Model for synaptic activity inducing glucose metabolism to supply lipids for neurite growth.

- A** Synaptic activity induces glucose metabolism at transcriptional level: Synaptic activity (1) induces Ca²⁺ transients (2) that activate the transcription factor CREB (3). CREB upregulates Glut3 expression to increase glucose uptake by neurons. CREB also induces Siah2 expression that together with LDH activity promotes the stabilization and activation of HIF-1 α (4, 5), which in turn activates the expression of genes encoding the rate-limiting enzymes of glycolysis.
- B** Transcriptional changes induced by synaptic activity increase glucose uptake and enhance glycolytic flux. As a result, metabolites such as acetyl-CoA are generated and used for lipid synthesis necessary for membrane extension during neurite growth. Some graphics in the figure were obtained and modified from Smart Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

Most of the glucose in the brain is oxidized to supply the large amounts of ATP required for maintaining membrane ion gradients and processes regulating synaptic transmission (Harris Julia *et al*, 2012; Rangaraju *et al*, 2014; Magistretti Pierre & Allaman, 2015). However, measurements of human brain glucose and oxygen consumption reveal that the total amount of glucose consumed is in excess of oxygen consumption (Vaishnavi *et al*, 2010; Goyal Manu *et al*, 2014). The utilization of aerobic glycolysis in the human brain differs across the developmental stages, with 35% of glucose being consumed aerobically after birth that falls to 10–12% in adulthood (Goyal Manu *et al*, 2014). This increased aerobic glycolysis during infancy correlates with the period of maximal neurite growth (Goyal Manu *et al*, 2014; Silbereis John *et al*, 2016). Neuronal differentiation *in vitro* shows increased expression levels of Glut3 and glycolysis enzymes, with 2-DG treatment of DIV1 cortical neurons blocking differentiation (Agostini *et al*, 2016). Our data show that glucose metabolism is necessary for axonal growth *in vitro* and dendritic growth *in vivo*. This may indicate that enhanced glycolysis does not trigger axonal or dendritic growth per se, but it is necessary to supply the building blocks required to enlarge the membranes regardless of whether the neurons are in axonal or dendritic growth state. Highly proliferative cancer cells rely on aerobic glycolysis, which it is known as the Warburg effect (Vander Heiden *et al*, 2009). Despite aerobic glycolysis being a less efficient way of generating ATP, it confers advantages to cancer cells such as the production of intermediates that support cell growth and division (Vander Heiden *et al*, 2009). Although postmitotic neurons do not divide, they undergo massive growth during differentiation. A neurite with a diameter of 1 μm elongating 0.55 $\mu\text{m}/\text{day}$ must expand its surface at a rate of around 1 $\mu\text{m}^2/\text{min}$ to reach 250,000 μm^2 which is the typical neuron surface area, compared with 1,256 μm^2 membrane surface of a spherical cell with 20 μm diameter (Pfenninger, 2009). Despite that glucose incorporation into lipids in the growth cone was not analyzed, several evidences strongly support the view that glucose-derived lipids are used to enlarge membranes: (i) Synaptic activity induced glucose uptake and metabolism and increased glucose incorporation into lipids but not glutamine incorporation into lipids; (ii) synaptic activity increased the total and cytosolic levels of the lipids precursor acetyl-CoA, which was dependent of glucose metabolism; (iii) pharmacological inhibition of glycolysis affected neurite growth *in vitro* and *in vivo*; (iv) knockdown of GPI, the second enzyme in the glycolysis, blocked both glucose incorporation into lipids and activity-mediated neurite growth; (v) knockdown of ACLY, the enzyme linking glycolysis with fatty acid metabolism, blocked both glucose incorporation into lipids and activity-mediated neurite growth; (vi) genetic manipulation of CREB, HIF-1 α , and Siah2 block both glucose incorporation into lipids and activity-mediated neurite growth; and (vii) HIF-1 α knockout in postnatal mice reduced dendritic architecture *in vivo*.

Astrocytes and neurons are metabolically coupled. The astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS) hypothesis proposes that the lactate produced by astrocytes is released and taken up by neurons to produce energy (Pellerin & Magistretti, 1994). Although there is a lot of evidence supporting the ANLS, there are also data that oppose this hypothesis (Pellerin & Magistretti, 2012; Patel *et al*, 2014; Lundgaard *et al*, 2015; Dienel, 2017). Here, we clearly demonstrate that synaptic activity boosts glucose uptake and metabolism in neurons, rather

than glial cells, by upregulating Glut3 and glycolysis genes. Increasing the proportion of glial cells in our primary cultures did not result in increased lactate release after stimulation, neither BDNF treatment affected lactate release in astrocytes unlike the stimulatory effect in lactate release in neuronal cultures. Moreover, glucose uptake in neurons was observed by live imaging, and HIF-1 α activation measured with luciferase reporters is based in neuronal-specific transfection protocol which nearly the totality of transfected cells are neurons (Soriano *et al*, 2008). In accordance with our results, a very recent study (Bas-Orth *et al*, 2017) showed synaptic activity caused an upregulation of glycolytic genes with the subsequent increase in glycolytic metabolism. Isolating neurons by FACS allowed the authors to conclude that the induction of glycolytic genes was produced in neurons. Despite strong evidence indicating that glucose metabolism is activated by synaptic activity in neurons, these results do not oppose the ANLS, but supports the notion that neurons take up and metabolize through glycolysis in certain conditions (Zala *et al*, 2013; Lundgaard *et al*, 2015; Jang *et al*, 2016; Ashrafi *et al*, 2017; Díaz-García *et al*, 2017). Cell division, migration, and neurite growth require extraordinary levels of energy that would explain why the supply of energy in neurons is not limited to the astrocytic lactate during pre- and postnatal stages. This is also seen in the support of cholesterol synthesis in neurons by astrocytes, which can supply sufficient levels of cholesterol to adult neurons unable to synthesize cholesterol, but cannot do so during the phase of maximal membrane growth (Füntschiiling *et al*, 2012).

Activity-mediated CREB activation plays a pivotal role in enhanced glucose metabolism. In neurons, CREB is a key transcription factor that regulates plasticity, cell survival, and neurite growth (Lonze & Ginty, 2002; Redmond *et al*, 2002; Greer & Greenberg, 2008; Bading, 2013). In peripheral tissues, CREB has a major metabolic role, regulating glucose and lipid metabolism in insulin-sensitive tissues (Altarejos & Montminy, 2011). As previously described (Rajakumar *et al*, 2004), we observed CREB-mediated regulation of Glut3 gene expression, the main glucose transporter in neurons. In addition, CREB promoted Siah2 gene expression and, consequently, HIF-1 α stabilization, which resulted in the increased gene expression of the rate-limiting enzymes involved in glycolysis. HIF-1 α is best known as a transcription factor that mediates adaptation to hypoxia. Genes associated with glucose metabolism are the largest functional group regulated by HIF-1 α (Semenza *et al*, 1994; Denko, 2008). HIF-1 α KO leads to embryonic lethality at E11, producing cardiovascular and brain malformations (Iyer *et al*, 1998; Ryan *et al*, 1998). HIF-1 α deletion in neuronal progenitors elicits cerebral cortex atrophy, defective brain development with fewer neural cells and impaired of spatial memory (Tomita *et al*, 2003); however, HIF-1 α deletion in mature neurons using CaMKII-CRE does not generate any evident major morphological defect (Helton *et al*, 2005). Here, we show that HIF-1 α deletion in early postnatal mice, a period of maximal afferent innervations and neurite growth, disturbs neurite architecture in the adult.

HIF-1 α activation is regulated at multiple levels. We observed that synaptic activity reduced PHD activity, while CREB upregulated the expression of the ubiquitin ligase Siah2 and that activity-dependent induction of Siah2 is necessary for stabilizing HIF-1 α . Siah2 KO mice exhibit mild phenotypes and do not show obvious brain abnormalities (Frew *et al*, 2003). However, the presence of other Siah proteins (1a and 1b) may explain this lack of phenotype,

given that double Siah1a/2 KO animals show a more severe phenotype regarding HIF-1 α activity than Siah2 KO mice (Nakayama *et al*, 2004). The first mechanism described by which Siah1 and 2 proteins stabilize HIF-1 α was by promoting proteasomal degradation of PHDs (Nakayama *et al*, 2004). However, we could not detect reduction in PHDs after synaptic activity. HIF-1 α is known to interact with more than one hundred proteins (Semenza, 2017), most of them regulating HIF-1 α stability. Among the interacting proteins, some of them have been shown to be targeted by Siah2, such as Polo-like kinase 3 (PLK3) that phosphorylates and destabilizes HIF-1 α (Xu *et al*, 2010), and Siah2-mediated PLK3 degradation results in HIF-1 α activation (Li *et al*, 2017). Sprouty2 promotes HIF-1 α ubiquitination (Hicks & Patel, 2016) and is regulated by Siah2 (Qi *et al*, 2008), and its downregulation promotes axonal growth (Hausott *et al*, 2009, 2012; Marvaldi *et al*, 2015); however, the link between these three observations has not been established. We observed that both Siah2 knockdown and LDH inhibition almost completely blocked activity-dependent HIF-1 α stabilization, what indicates that they may share a common regulatory pathway. Acid pH and LDH promote the non-canonical conversion of 2-oxoglutarate to L-2-HG which functions as a potent inhibitor of PHDs (Burr Stephen *et al*, 2016; Nadtochiy *et al*, 2016; Intlekofer *et al*, 2017). Disruption of the OGDHC results in accumulation of oxoglutarate with the subsequent increase in L-2-HG and HIF-1 α stabilization (Burr Stephen *et al*, 2016). Siah2 has been reported to disrupt the OGDHC complex (Habelhah *et al*, 2004; Sun Ramon & Denko Nicholas, 2014), but acute synaptic activity did not affect the protein levels of OGDHC. Future studies will be aimed to understand the interrelationship between Siah2 and LDH to promote activity-mediated HIF-1 α stabilization.

Disruption of dendritic development is the most consistent anatomical finding in mental retardation (Kaufmann & Moser, 2000). The role of abnormal cytoskeletal remodeling has been associated with mental retardation in some syndromes but further studies are required to determine how glucose metabolism is affected. Glut1 deficiency syndrome or chronic hypoglycemia (congenital or early infantile) causes the syndrome of glycopenia which is characterized by seizures, developmental delay, and mental retardation (Pascual *et al*, 2007). Here, we have shown that activity-mediated neurite growth requires enhanced glucose metabolism to supply lipids for membrane enlargement. Further studies are required to determine how glucose metabolism is affected in intellectual development disorders. Those studies could lead to the possibility of manipulating glucose metabolism to treat of some forms of intellectual development disorders.

Material and Methods

Cell culture and stimulation

Cortical neurons from E21 Sprague Dawley rats were cultured as described previously (Martorell-Riera *et al*, 2015). See Appendix Supplementary Methods.

HIF-1 α gene inactivation *in vivo*

To study the *in vivo* role of HIF-1 α in neuronal architecture, we used previously described HIF1 α floxed UBC-CRE-ERT2 mice

(Soro-Arnaiz *et al*, 2016). These mice ubiquitously express a tamoxifen-inducible CRE recombinase (cre-ERT2) that allows global inactivation of HIF-1 α locus flanked by two LoxP sites upon 4OH-tamoxifen treatment. For HIF-1 α gene inactivation, the newborn mice received tamoxifen via breastfeeding from the mother. Weaning mothers were injected intraperitoneally with 4OH-tamoxifen daily for 5 days (2 mg/day) starting 3–5 days post-partum. After this period, females were returned to a standard mouse diet. Once newborns reached adulthood (4–6 months), neuronal architecture was analyzed. Mice were kept under specific pathogen-free conditions at the animal facility at the Autonomous University of Madrid (UAM).

3PO administration

See Appendix Supplementary Methods.

Histology

See Appendix Supplementary Methods.

Transfection, plasmids, and virus generation

Neurons were transfected at DIV8 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Transfection efficiency was approximately 5% in which nearly the totality of transfected cells is neurons (Soriano *et al*, 2008).

Neurons were infected with rAAV at DIV4. Infection efficiencies were determined at DIV 10–11 by analyzing GFP fluorescence or immunocytochemical analysis and were observed to range from 70 to 85% of the viable neurons. See Appendix Supplementary Methods.

Neurite length measurement

Cortical neurons were transfected with a plasmid expressing GFP, and neurons were fixed 48 h later with 4% paraformaldehyde, permeabilized, blocked, and incubated overnight at 4°C with anti-GFP antibody (1:750, A11122, Life Technologies). Antibody binding was visualized using a biotinylated secondary antibody (1:200, Jackson Immuno Research) and Cy3-conjugated streptavidin (1:500, Jackson Immuno Research). Preparations were mounted on VECTA-SHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories).

Images were taken blindly at 4 \times magnification using an Olympus BX61 microscope equipped with an Olympus DP70 camera. Neurites were manually traced and analyzed using Simple Neurite Tracer software (Longair *et al*, 2011).

Luciferase assays

Cells were transfected with firefly luciferase-based reporter plasmid along with a Renilla expressing vector (pTK-RL; Promega), together with, where relevant, an HIF-DN or A-CREB expression vector. Luciferase assays were performed using the Dual Glo Luciferase Assay system (Promega) with firefly luciferase-based reporter gene activity normalized to the Renilla control (pTK-RL plasmid), except the CMV-ODD-Luc and CMV-Luc experiments that were normalized to CMV-Renilla.

RNA isolation, RT-PCR, and qPCR

RNA was isolated using an PureLink™ RNA mini kit (Life Technologies). For qPCR, cDNA was synthesized from RNA using the SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. qPCR was performed in a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystem) using GoTaq qPCR Master Mix (Promega) according to the manufacturer's instructions. See Appendix Supplementary Methods.

Western blotting and antibodies

See Appendix Supplementary Methods.

Acetyl-CoA and CoA determination

Acetyl-CoA and CoA levels were measured using the acetyl-coenzyme A and CoA Assay Kits, respectively (Sigma). See Appendix Supplementary Methods.

Glucose uptake measurements

The uptake of 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxyglucose (2-NBDG, Life Technologies), a fluorescent glucose analog, was used to measure glucose transport. Cortical neurons were rinsed three times with phenol-red free SGG medium with reduced glucose concentration (0.5 mM) and incubated with 100 μ M 2-NBDG in reduced glucose SGG medium for 30 min at 37°C and 5% CO₂. Cultures were washed three times with phenol-red free SGG medium to remove free 2-NBDG. Accumulation of intracellular 2-NBDG, measured using an excitation wavelength of 488 nm, was imaged under a Leica DMIRB microscope equipped with a Leica DFC 550 camera at 40 \times magnification. ROIs of the same surface were drawn in the soma, and fluorescence intensity was analyzed using ImageJ (Schneider *et al*, 2012).

Imaging studies

Neurons were visualized using a TCS SP2 Leica confocal laser scanning microscope (Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Germany) adapted to an inverted Leitz DMIRBE microscope at 37°C in a controlled 5% CO₂ atmosphere (Life Imaging Services). Pictures were acquired using a 40 \times (1.25–0.75 NA) Leitz Plan-Apochromatic objective. Images were analyzed using ImageJ software.

Cytoplasmic Ca²⁺ was monitored with Fluo-4 (Life Technologies). Neurons were loaded 2 μ M Fluo-4 for 45 min at room temperature in phenol-red free SGG medium with 10 mM HEPES and 10 mM glucose. After three washes with phenol-red free SGG medium, neurons were de-esterified for 30 min at room temperature, excited at 488 nm, and emission captured with a 516-nm filter.

For hypoxia analysis, neurons were loaded with 10 μ M Image-IT Hypoxia Reagent (Life Technologies) in HBSS medium and placed in an incubator chamber attached to the microscope, which was flushed with 95% N₂/5% CO₂ at a flow rate of 20 l/min at 37°C for 30 min. Non-hypoxic neurons were maintained in normoxic conditions during probe incubation. Neurons were excited at 490 nm, and emission was measured using a 610-nm filter.

Lactate measurement

The culture medium was filtered using 10K Amicon Ultra-0.5 ml centrifugal filters (EMD Millipore). Then, 50 μ l of medium was incubated with 200 μ l of reaction buffer (320 mM glycine, 320 mM hydrazine, 2.4 mM NAD⁺, and 2 U/ml of lactate dehydrogenase (LDH)). After 30 min of incubation at room temperature, the lactate-dependent generation of NADH was measured at 340 nm using the Infinite 200 PRO multimode reader (Tecan). Lactate levels were normalized by total protein levels, quantified using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

Glucose and glutamine incorporation into lipids

Neurons were grown on glass coverslips for 48 h in a medium containing 0.8 μ Ci/ml ¹⁴C-U-glucose (Perkin-Elmer) or 2 μ Ci/ml L-3-4-³H(N)-glutamine (Perkin-Elmer). Lipid isolation was performed as described previously by Folch *et al* (1957). See Appendix Supplementary Methods.

ATP measurement

ATP levels were measured using the ATPlite Luminescence Assay System (Perkin-Elmer) on the Infinite 200 PRO multimode reader (TECAN) following the manufacturer's instructions. ATP levels were normalized by total protein levels, quantified using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

Statistical analysis

Statistical analysis involved two-tailed Student's *t*-tests. For any multiple comparisons within data sets, we used a one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. All data are presented as the mean \pm s.e.m. of at least three independent experiments (*n*). A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad/FEDER funds (SAF2011-30283 and SAF2014-59872-P to FXS; SAF2016-76815-R to JA; BFU2015-68135-P to OMM-E) and Fundación Ramón Areces (to OMM-E). MS-M is the recipient of a predoctoral fellowship from Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno.

Author contributions

MS-M designed and performed most of the experiments and analyzed data; SC-D, MR-P, CM-S designed and performed experiments and analyzed data; AM-R and IH performed experiments and analyzed data; JA performed HIF-1 α gene inactivation *in vivo* and had critical input into the manuscript preparation; MR and OMM-E analyzed data and had critical input into the manuscript preparation; FXS conceived, designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Agostini M, Romeo F, Inoue S, Niklison-Chirou MV, Elia AJ, Dinsdale D, Morone N, Knight RA, Mak TW, Melino G (2016) Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Differ* 23: 1502–1514
- Ahn S, Olive M, Aggarwal S, Krylov D, Ginty DD, Vinson C (1998) A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. *Mol Cell Biol* 18: 967–977
- Altarejos JY, Montminy M (2011) CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 141–151
- Ashrafi G, Wu Z, Farrell RJ, Ryan TA (2017) GLUT4 mobilization supports energetic demands of active synapses. *Neuron* 93: 606–615.e603
- Bading H (2013) Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nat Rev Neurosci* 14: 593–608
- Bas-Orth C, Tan Y-W, Lau D, Bading H (2017) Synaptic activity drives a genomic program that promotes a neuronal Warburg effect. *J Biol Chem* 292: 5183–5194
- Bélanger M, Allaman I, Magistretti Pierre J (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14: 724–738
- Burr Stephen P, Costa Ana SH, Grice Guinevere L, Timms Richard T, Lobb Ian T, Freisinger P, Dodd Roger B, Dougan G, Lehner Paul J, Frezza C, Nathan James A (2016) Mitochondrial protein lipoylation and the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex controls hif1 α stability in aerobic conditions. *Cell Metab* 24: 740–752
- Denko NC (2008) Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 8: 705–713
- Díaz-García CM, Mongeon R, Lahmann C, Koveal D, Zucker H, Yellen G (2017) Neuronal stimulation triggers neuronal glycolysis and not lactate uptake. *Cell Metab* 26: 361–374.e364
- Dienel GA (2017) Lack of appropriate stoichiometry: strong evidence against an energetically important astrocyte-neuron lactate shuttle in brain. *J Neurosci Res* 95: 2103–2125
- Divakaruni AS, Wallace M, Buren C, Martyniuk K, Andreyev AY, Li E, Fields JA, Cordes T, Reynolds IJ, Bloodgood BL, Raymond LA, Metallo CM, Murphy AN (2017) Inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier protects from excitotoxic neuronal death. *J Cell Biol* 216: 1091–1105
- Dotti C, Sullivan C, Banker G (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8: 1454–1468
- Faherty CJ, Kerley D, Smeyne RJ (2003) A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Dev Brain Res* 141: 55–61
- Ferreira JM, Burnett AL, Rameau GA (2011) Activity-dependent regulation of surface glucose transporter-3. *J Neurosci* 31: 1991–1999
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497–509
- Frew IJ, Hammond VE, Dickins RA, Quinn JMW, Walkley CR, Sims NA, Schnall R, Della NG, Holloway AJ, Digby MR, Janes PW, Tarlinton DM, Purton LE, Gillespie MT, Bowtell DDL (2003) Generation and analysis of Siah2 mutant mice. *Mol Cell Biol* 23: 9150–9161
- Fünfschilling U, Jockusch WJ, Sivakumar N, Möbius W, Corthals K, Li S, Quintes S, Kim Y, Schaap IAT, Rhee J-S, Nave K-A, Saher G (2012) Critical time window of neuronal cholesterol synthesis during neurite outgrowth. *J Neurosci* 32: 7632–7645
- Goldberg JL, Espinosa JS, Xu Y, Davidson N, Kovacs GTA, Barres BA (2002) Retinal ganglion cells do not extend axons by default. *Neuron* 33: 689–702
- Goldberg JL (2003) How does an axon grow? *Genes Dev* 17: 941–958
- Goyal Manu S, Hawrylycz M, Miller Jeremy A, Snyder Abraham Z, Raichle Marcus E (2014) Aerobic glycolysis in the human brain is associated with development and neotenus gene expression. *Cell Metab* 19: 49–57
- Greer PL, Greenberg ME (2008) From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron* 59: 846–860
- Groc L, Petanjek Z, Gustafsson B, Ben-Ari Y, Hanse E, Khazipov R (2002) *In vivo* blockade of neural activity alters dendritic development of neonatal CA1 pyramidal cells. *Eur J Neurosci* 16: 1931–1938
- Habelhah H, Laine A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Gershwin ME, Bowtell DDL, Ronai Z (2004) Regulation of 2-oxoglutarate (α -Ketoglutarate) dehydrogenase stability by the ring finger ubiquitin ligase siah. *J Biol Chem* 279: 53782–53788
- Hardingham GE, Arnold FJL, Bading H (2001) Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* 4: 261–267
- Harris Julia J, Jolivet R, Attwell D (2012) Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75: 762–777
- Hausott B, Vallant N, Auer M, Yang L, Dai F, Brand-Saberi B, Klimaschewski L (2009) Sprouty2 down-regulation promotes axon growth by adult sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 42: 328–340
- Hausott B, Vallant N, Schlick B, Auer M, Nimmervoll B, Obermair GJ, Schwarzer C, Dai F, Brand-Saberi B, Klimaschewski L (2012) Sprouty2 and -4 regulate axon outgrowth by hippocampal neurons. *Hippocampus* 22: 434–441
- Helton R, Cui J, Scheel JR, Ellison JA, Ames C, Gibson C, Blouw B, Ouyang L, Dragatsis I, Zeitlin S, Johnson RS, Lipton SA, Barlow C (2005) Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1 α reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage. *J Neurosci* 25: 4099–4107
- Hicks KC, Patel TB (2016) Sprouty2 protein regulates hypoxia-inducible factor- α (HIF α) protein levels and transcription of HIF α -responsive genes. *J Biol Chem* 291: 16787–16801
- Intlekofer AM, Wang B, Liu H, Shah H, Carmona-Fontaine C, Rustenburg AS, Salah S, Gunner MR, Chodera JD, Cross JR, Thompson CB (2017) L-2-Hydroxyglutarate production arises from noncanonical enzyme function at acidic pH. *Nat Chem Biol* 13: 494–500
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin Jr WG (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292: 464–468
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 12: 149–162
- Jaakkola P, Mole DR, Tian Y-M, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim AV, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF- α to the von hippel-lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468–472
- Jang S, Nelson Jessica C, Bend Eric G, Rodríguez-Laureano L, Tueros Felipe G, Cartagenova L, Underwood K, Jorgensen Erik M, Colón-Ramos Daniel A (2016) Glycolytic enzymes localize to synapses under energy stress to support synaptic function. *Neuron* 90: 278–291
- Kaufmann WE, Moser HW (2000) Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex* 10: 981–991
- Konur S, Ghosh A (2005) Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron* 46: 401–405
- Li Y-X, Zhang Y, Lester HA, Schuman EM, Davidson N (1998) Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18: 10231–10240

- Li C, Park S, Zhang X, Dai W, Xu D (2017) Mutual regulation between Polo-like kinase 3 and SIAH2 E3 ubiquitin ligase defines a regulatory network that fine-tunes the cellular response to hypoxia and nickel. *J Biol Chem* 292: 11431–11444
- Longair MH, Baker DA, Armstrong JD (2011) Simple neurite tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics* 27: 2453–2454
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35: 605–623
- Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD (2002) Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron* 34: 371–385
- Lu H, Forbes RA, Verma A (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277: 23111–23115
- Lundgaard I, Li B, Xie L, Kang H, Sanggaard S, Haswell JDR, Sun W, Goldman S, Blekot S, Nielsen M, Takano T, Deane R, Nedergaard M (2015) Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. *Nat Commun* 6: 6807
- Magistretti Pierre J, Allaman I (2015) A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron* 86: 883–901
- Martorell-Riera A, Segarra-Mondejar M, Reina M, Martínez-Estrada OM, Soriano FX (2015) Mitochondrial fragmentation in excitotoxicity requires ROCK activation. *Cell Cycle* 14: 1365–1369
- Marvaldi L, Thongrong S, Kozłowska A, Irschick R, Pritz CO, Bäumer B, Ronchi G, Geuna S, Hausott B, Klimaschewski L (2015) Enhanced axon outgrowth and improved long-distance axon regeneration in sprouty2 deficient mice. *Dev Neurobiol* 75: 217–231
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang G-W, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399: 271–275
- Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75: 875–886
- Nadtochiy SM, Schafer X, Fu D, Nehrke K, Munger J, Brookes PS (2016) Acidic pH is a metabolic switch for 2-hydroxyglutarate generation and signaling. *J Biol Chem* 291: 20188–20197
- Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoumik A, Kadoya T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Frappell PB, Bowtell DD, Ronai Z (2004) Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 α abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 117: 941–952
- Ohira K, Kumanogoh H, Sahara Y, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M (2005) A truncated tropo-myosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via rho GDP dissociation inhibitor 1. *J Neurosci* 25: 1343–1353
- Papadia S, Soriano FX, Leveille F, Martel MA, Dakin KA, Hansen HH, Kaindl A, Siffringer M, Fowler J, Stefovská V, McKenzie G, Craigon M, Corriveau R, Ghazal P, Horsburgh K, Yankner BA, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Hardingham GE (2008) Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci* 11: 476–487
- Park H, Poo M-M (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14: 7–23
- Pascual JM, Wang D, Hinton V, Engelstad K, Saxena CM, Van Heertum RL, De Vivo DC (2007) Brain glucose supply and the syndrome of infantile neuroglycopenia. *Arch Neurol* 64: 507–513
- Patel AB, Lai JCK, Chowdhury GMI, Hyder F, Rothman DL, Shulman RG, Behar KL (2014) Direct evidence for activity-dependent glucose phosphorylation in neurons with implications for the astrocyte-to-neuron lactate shuttle. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 5385–5390
- Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10625–10629
- Pellerin L, Magistretti PJ (2012) Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab* 32: 1152–1166
- Pfenninger KH (2009) Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. *Nat Rev Neurosci* 10: 251–261
- Pietrocola F, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Madeo F, Kroemer G (2015) Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab* 21: 805–821
- Puram SV, Bonni A (2013) Cell-intrinsic drivers of dendrite morphogenesis. *Development* 140: 4657–4671
- Qi J, Nakayama K, Gaitonde S, Goydos JS, Krajewski S, Eroshkin A, Bar-Sagi D, Bowtell D, Ronai Z (2008) The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16713–16718
- Rajakumar A, Thamocharan S, Raychaudhuri N, Menon RK, Devaskar SU (2004) Trans-activators regulating neuronal glucose transporter isoform-3 gene expression in mammalian neurons. *J Biol Chem* 279: 26768–26779
- Rajan I, Cline HT (1998) Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites *in vivo*. *J Neurosci* 18: 7836–7846
- Rangaraju V, Calloway N, Ryan Timothy A (2014) Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. *Cell* 156: 825–835
- Redmond L, Kashani AH, Ghosh A (2002) Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* 34: 999–1010
- Rose CR, Blum R, Pichler B, Lepier A, Kafitz KW, Konnerth A (2003) Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426: 74–78
- Ryan HE, Lo J, Johnson RS (1998) HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 17: 3005–3015
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671–675
- Schoors S, De Bock K, Cantelmo Anna R, Georgiadou M, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Kuchnio A, Wong Brian W, Quaegebeur A, Goveia J, Bifari F, Wang X, Blanco R, Tembuysen B, Cornelissen I, Bouché A, Vinckier S, Diaz-Moralli S, Gerhardt H, Telang S et al (2014) Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis. *Cell Metab* 19: 37–48
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269: 23757–23763
- Semenza GL (2017) A compendium of proteins that interact with HIF-1 α . *Exp Cell Res* 356: 128–135
- Silbereis John C, Pochareddy S, Zhu Y, Li M, Sestan N (2016) The cellular and molecular landscapes of the developing human central nervous system. *Neuron* 89: 248–268
- Silver I, Erecinska 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. *J Neurosci* 14: 5068–5076
- Soriano FX, Léveillé F, Papadia S, Higgins LG, Varley J, Baxter P, Hayes JD, Hardingham GE (2008) Induction of sulfiredoxin expression and reduction

- of peroxiredoxin hyperoxidation by the neuroprotective Nrf2 activator 3H-1,2-dithiole-3-thione. *J Neurochem* 107: 533–543
- Soro-Arnaiz I, Li Qilong Oscar Y, Torres-Capelli M, Meléndez-Rodríguez F, Veiga S, Veys K, Sebastian D, Elorza A, Tello D, Hernansanz-Agustín P, Cogliati S, Moreno-Navarrete Jose M, Balsa E, Fuertes E, Romanos E, Martínez-Ruiz A, Enriquez Jose A, Fernandez-Real Jose M, Zorzano A, De Bock K et al (2016) Role of mitochondrial complex IV in age-dependent obesity. *Cell Rep* 16: 2991–3002
- Sun Ramon C, Denko Nicholas C (2014) Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth. *Cell Metab* 19: 285–292
- TeSlaa T, Teitell MA (2014) Chapter Five – Techniques to monitor glycolysis. In *Methods in enzymology*, Galluzzi L, Kroemer G (eds), Vol. 542, pp 91–114. San Diego, CA: Academic Press
- Tomita S, Ueno M, Sakamoto M, Kitahama Y, Ueki M, Maekawa N, Sakamoto H, Gassmann M, Kageyama R, Ueda N, Gonzalez FJ, Takahama Y (2003) Defective brain development in mice lacking the Hif-1 α gene in neural cells. *Mol Cell Biol* 23: 6739–6749
- Vaishnavi SN, Vlassenko AG, Rundle MM, Snyder AZ, Mintun MA, Raichle ME (2010) Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 17757–17762
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029–1033
- Wong ROL, Ghosh A (2002) Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci* 3: 803–812
- Xu D, Yao Y, Lu L, Costa M, Dai W (2010) PI3K functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1 α . *J Biol Chem* 285: 38944–38950
- Zala D, Hinkelmann M-V, Yu H, Lyra da Cunha Marcel M, Liot G, Cordelières Fabrice P, Marco S, Saudou F (2013) Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell* 152: 479–491
- 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 isotopomers. *Sci Rep* 7: 8489