



Universidad Autónoma
de Madrid

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**Regulación de la autofagia ante estímulos
metabólicos en astrocitos**

TESIS DOCTORAL

Ana Ortiz Rodríguez

Madrid, 2019

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina



Universidad Autónoma
de Madrid

Regulación de la autofagia ante estímulos metabólicos en astrocitos

Memoria presentada por Ana Ortiz Rodríguez, graduada en Biología Sanitaria
por la Universidad de Alcalá, bajo la dirección de los doctores:

M^a Ángeles Arévalo Arévalo

Científica Titular CSIC

Luis Miguel García Segura

Profesor de Investigación CSIC

Madrid, 2019

AGRADECIMIENTOS

Todavía no me puedo creer que hoy esté escribiendo las últimas páginas de mi tesis, después de que los últimos cuatro años se hayan pasado volando. Todos los que os habéis adentrado en el mundo del doctorado (y también los que nos rodeáis) sabéis que este no es un camino fácil, pues te pone a prueba en bastantes ocasiones. Sin embargo, supone un aprendizaje continuo, no sólo a nivel científico sino también personal. Aprendes a luchar por conseguir lo que quieres y a no darte por vencido la primera vez que algo sale mal. Además, esta etapa te demuestra que eres capaz de hacer muchas más cosas de las que imaginabas. Algo esencial para superar las dificultades con las que te vas encontrado durante la tesis es estar bien rodeado. Por eso hoy quiero agradecer su apoyo y ayuda a todas las personas que han estado cerca de mí a lo largo de este camino, sin las cuales habría sido mucho más difícil alcanzar la meta.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, Ángeles y Luis Miguel, su confianza en mí para realizar la tesis en el C-01. Gracias por ser tan cercanos, y estar siempre dispuestos a escucharme y ayudarme a resolver mis dudas. Tener la oportunidad de discutir mis reflexiones científicas y vitales con vosotros ha sido muy valioso durante estos años. También quiero agradecer a Íñigo toda su ayuda y paciencia con el experimento de microscopía electrónica. Gracias por enseñarme tanto de un mundo totalmente desconocido para mí.

El C-01 se ha convertido en mi segunda casa durante los últimos cinco años de mi vida. En este tiempo han pasado por aquí muchas personas diferentes, procedentes de lugares del mundo muy distintos. A todos vosotros os quiero agradecer vuestra ayuda siempre que la he necesitado y vuestras ganas de hacerme la rutina más divertida. Gracias también por contagiarme vuestra pasión por la ciencia y permitirme aprender tanto de cada uno de vosotros. Además, de entre todas las personas que he tenido el placer de conocer aquí, dos se han convertido en grandes amigas. Estefanía e Isa, gracias por vuestra ayuda incondicional, por hacerme pasar algunos de los mejores momentos de mi etapa en el C-01 y por apoyarme tanto siempre que lo he necesitado. Aunque os he echado mucho de menos en el laboratorio durante la recta final de esta tesis, me alegra haberos sentido tan cerca.

Esta tesis también me ha permitido vivir una de las experiencias más enriquecedoras que he tenido nunca: mi estancia en Múnich. Muchas gracias Cristina por hacerla posible al acogerme en tu laboratorio y ayudarme a que todo fuese más fácil allí. También quiero que dar las gracias a mis compañeros del *Astrocyte-Neuron Networks* por enseñarme tanto en los meses que pasé con ellos.

Además, me gustaría agradecer de manera especial a Isma, Luiza, Cassie, René y Fran su cálida acogida y su esfuerzo por hacerme disfrutar de la vida en Múnich.

Aunque el laboratorio ha sido el escenario principal de estos años de tesis, tengo la suerte de contar con grandes amigos fuera de él. En primer lugar, quiero agradecer su apoyo a mi grupo de “biosanis”, que han hecho que la universidad sea una de mis etapas favoritas en la vida. Los años han ido pasando y, aunque a veces resulte difícil vernos, es maravilloso compartir un rato con vosotros. Gracias a Andrés por tus bromas y cotilleos, a Bea por tus ganas de echar siempre una mano e inmortalizar nuestros grandes momentos juntos, a Diego por tu risa contagiosa y a Irene por tu serenidad. Juntos hemos vivido aventuras muy especiales y quiero agradecerte tu apoyo durante gran parte del camino. Carla, tú que me conoces tan bien, has sido un apoyo imprescindible durante esta etapa. Muchas gracias por estar dispuesta a ayudarme siempre, especialmente en la recta final de esta tesis (cuando parecía que no lo iba a conseguir). Gracias por contagiarme esa alegría y esas ganas locas de exprimir la vida ante cualquier situación. Nuestras tardes de cañas y cenas con conversaciones interminables han sido la mejor terapia para sobrellevar la tesis. Ahora que ya eres doctora y que a mí me queda poco para serlo, espero que podamos continuar viviendo grandes momentos juntos. Por último, tampoco podía faltar en estos agradecimientos mi amiga Sonia. Las clases de inglés nos unieron hace más de diez años y no me puedo alegrar más de aquella coincidencia. Siempre es un placer volvernos a encontrar y ponernos al día como si el tiempo no hubiese pasado por nosotras.

Para el final me reservo los agradecimientos más especiales. Torcu, gracias por enseñarme a ver la vida desde otra perspectiva y apoyarme cada día, especialmente durante los últimos meses en los que la escritura de la tesis me ha puesto a prueba. Estos dos años juntos han estado llenos de felicidad y sólo deseo seguir disfrutando de la vida a tu lado. Papá y mamá, sin vosotros no podría haber llegado donde estoy hoy. Gracias por enseñarme con vuestro ejemplo que es necesario esforzarse para conseguir lo que uno desea. También quiero agradecer vuestro amor y apoyo incondicional, especialmente cuando parecía que todo iba mal. Pablo, gracias por ser el mejor compañero de aventuras que puede existir. Gracias por cuidar siempre de mí y contagiarme tus ganas de comerme el mundo, eres todo un ejemplo a seguir para mí. Por último, Rosario, Javi y Javier, quiero agradecer el hacerme pasar tan buenos ratos en familia, vuestro cariño y vuestro intento por entender de qué va esta tesis.

*“Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido.
Ahora es el momento de comprender más, para temer menos”.*

Marie Curie

RESUMEN

La autofagia es un proceso esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular. Junto con el control de calidad de los componentes citoplasmáticos, una de sus funciones más importantes es la obtención de nutrientes y la movilización de lípidos en condiciones de estrés metabólico. A pesar del papel de la autofagia en el metabolismo, este proceso no ha sido estudiado en profundidad en los astrocitos, un tipo celular esencial en el control metabólico del organismo. Debido a ello, caracterizamos la regulación de la autofagia ante estímulos metabólicos como el ayuno prolongado, el tratamiento con estradiol y la exposición al ácido palmítico en cultivos de astrocitos. Además, estudiamos en profundidad la respuesta de los astrocitos al ácido palmítico, midiendo diversos parámetros como la inflamación, el estrés de retículo endoplásmico y la muerte celular. Junto con dichos parámetros, evaluamos la organización y la actividad de los complejos mitocondriales en respuesta a este ácido graso. Los resultados obtenidos en estos estudios se analizaron por separado en machos y hembras para detectar la existencia de diferencias sexuales, un fenómeno ampliamente descrito a nivel metabólico. Por último, se caracterizó la respuesta autofágica en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratones hembra adultos tras el consumo agudo de una dieta rica en grasa.

A partir de estos experimentos, se comprobó que los astrocitos son capaces de regular la autofagia en respuesta a estímulos metabólicos. De esta forma, el ayuno prolongado incrementa el flujo de autofagia en los astrocitos mientras que el tratamiento con estradiol lo disminuye. Cuando los astrocitos son tratados con ácido palmítico, se induce un bloqueo inicial de la autofagia que, acompañado de otras alteraciones como la inflamación o el estrés de retículo endoplásmico, disminuye la viabilidad de los astrocitos. Además, el ácido palmítico modifica la actividad de los complejos mitocondriales y su organización en supercomplejos, afectando de la misma manera a los astrocitos de los machos que de las hembras. Sin embargo, existen diferencias sexuales en la organización y actividad basales de los complejos mitocondriales en los astrocitos. Por último, un estímulo metabólico *in vivo* como el consumo agudo de dieta rica en grasa parece modificar la autofagia en las neuronas y las células gliales del núcleo arcuato en ratones adultos.

ABSTRACT

Autophagy is an essential process in the maintenance of cellular homeostasis. Together with the quality control of cytoplasmic components, one of its more important functions is to obtain nutrients and mobilize lipids under conditions of metabolic stress. Although autophagy has an important role in metabolism, it has not been deeply characterized in astrocytes, an essential cell type in the regulation of systemic metabolism. Due to the lack of information about it, we studied the regulation of autophagy after metabolic stimuli like prolonged starvation, estradiol treatment and exposure to palmitic acid in astrocyte cultures. Furthermore, we characterized the response of astrocytes to palmitic acid, analyzing diverse parameters such as inflammation, endoplasmic reticulum stress and cell death. Moreover, organization and activity of mitochondrial complexes were assessed in response to palmitic acid. All the results obtained from these studies were analyzed separately in males and females in order to detect sex differences, a phenomenon widely described in metabolic responses. Finally, we assessed autophagic activity in the arcuate nucleus of female adult mice after a short-term exposure to high fat diet.

Astrocytes are able to modulate autophagy in response to metabolic stimuli. Prolonged starvation increases autophagic flux in astrocytes while estradiol treatment suppresses it. When astrocytes are treated with palmitic acid, there is an initial blockade in autophagy. If this suppression in autophagy is accompanied by inflammation and endoplasmic reticulum stress, it induces loss of astrocyte viability. Furthermore, palmitic acid modifies the activity and organization of mitochondrial complexes in astrocytes. Although there are no sex differences in mitochondrial analysis in response to palmitic acid, some differences are detected in the basal activity and organization of mitochondrial complexes between astrocytes from males and females. Finally, a metabolic stimulus *in vivo* as a short-term high fat diet consumption seems to modify autophagy in neurons and glial cells in the arcuate nucleus of adult mice.

ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	11
1. Regulación central del metabolismo	13
2. Papel metabólico de los astrocitos	14
3. Obesidad	15
3.1. Modelos animales de obesidad	15
3.2. Papel de la inflamación en la obesidad	16
3.3. Impacto de los ácidos grasos saturados en el cerebro	17
4. Autofagia	18
4.1. Definición y tipos de autofagia	18
4.2. Autofagia selectiva	20
4.3. Funciones de la autofagia	21
4.4. Papel de la autofagia en la regulación energética	22
4.5. Regulación de la autofagia mediante el ayuno	23
5. Organización mitocondrial	24
6. Diferencias sexuales en la respuesta metabólica	26
7. Justificación de los objetivos de la tesis	28
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Animales	35
2. Administración de HFD y medida de parámetros metabólicos	35
3. Perfusión y fijación del tejido	36
4. Procesamiento del tejido para microscopía electrónica de transmisión	36
5. Análisis de autofagosomas mediante microscopía electrónica de transmisión	37
6. Cultivos primarios de astrocitos	38
7. Tratamientos celulares	40
7.1. Tratamiento con ácido palmítico (PA)	40
7.2. Tratamiento con agonistas de los receptores de estrógeno (ER)	40
7.3. Tratamiento con inhibidores	41
7.4. Ayuno	42
8. Western blot	42
9. Aislamiento y solubilización de mitocondrias	43
10. BN-PAGE	44
11. Ensayos de actividad en gel de los complejos mitocondriales	44

12. Ensayos de viabilidad celular	45
13. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)	45
14. Inmunoquímica	46
15. Análisis estadístico	47
RESULTADOS	49
<hr/>	
1. Modulación de la autofagia mediante el ayuno prolongado en astrocitos	51
2. Regulación de la autofagia tras el tratamiento con estradiol en astrocitos	54
3. Caracterización de los efectos del PA en astrocitos	59
3.1. El PA modula la autofagia en los astrocitos	59
3.2. El PA induce una respuesta inflamatoria en los astrocitos	61
3.3. El PA disminuye la viabilidad de los astrocitos	63
3.4. El PA reduce la transcripción de los ER en los astrocitos de las hembras	63
3.5. El tratamiento con compuestos estrogénicos no impide la pérdida de viabilidad de los astrocitos inducida por el PA	64
3.6. La inducción de la autofagia mediante rapamicina no protege a los astrocitos del efecto inflamatorio y deletéreo del PA	66
3.7. El PA bloquea la autofagia antes de inducir inflamación y pérdida de viabilidad en los astrocitos	68
3.8. El bloqueo de la autofagia no modifica la viabilidad ni la expresión de CHOP de los astrocitos	72
3.9. El PA modifica la organización y actividad mitocondrial en los astrocitos	74
4. Análisis de la autofagia en un modelo de consumo agudo de HFD	79
4.1. La administración de HFD a corto plazo modifica algunos parámetros metabólicos	79
4.2. El consumo agudo de HFD no modifica significativamente la presencia de autofagosomas en el núcleo arcuato	81
DISCUSIÓN	89
<hr/>	
1. Regulación de la autofagia por ayuno prolongado en astrocitos	91
2. Modulación de la autofagia por estradiol en cultivos de astrocitos	93
3. Efectos del PA en cultivos de astrocitos	95
4. Modulación de la autofagia hipotalámica en un modelo de consumo agudo de HFD	102
CONCLUSIONES	107
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA	111
<hr/>	
ANEXO I	135
<hr/>	
ANEXO II	153

CLAVE DE ABREVIATURAS

α-MSH	Hormona estimulante de melanocitos α (<i>α-melanocyte-stimulating hormone</i>)
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AgRP	Proteína r-agoutí (<i>agouti-related protein</i>)
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP (<i>AMP-activated protein kinase</i>)
ANOVA	Análisis de la varianza (<i>analysis of variance</i>)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr 18S	Ácido ribonucleico ribosómico 18S
Atg o ATG	Gen o proteína relacionada con la autofagia (<i>AuTophagy-related</i>)
ATPB	Subunidad β de la ATP sintasa
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BN-PAGE	Electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida (<i>blue native polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
CHOP	Proteína homóloga a C/EBP (<i>C/EBP-homologous protein</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DMEM-F12	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>) y suplemento F-12 en proporción 1:1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	Dimetoato
DPN	2,3-bis(4-Hidroxifenil)-propionitrilo
E2	17 β -estradiol
ECL	Reactivo de quimioluminiscencia mejorado (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EEM	Error estándar de la media
ER	Receptor de estrógeno (<i>estrogen receptor</i>)
ETF	Flavoproteína transportadora de electrones (<i>electron transfer flavoprotein</i>)
FBS	Suero fetal bovino (<i>fetal bovine serum</i>)
FDA	Diacetato de fluoresceína (<i>fluorescein diacetate</i>)
FIP200	Proteína de interacción con la familia de la quinasa FAK de 200 kDa (<i>FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa</i>)
G1	1-[(3aR*,4S*,9bS*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinolin-8-yl]-etanona
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)

GFP	Proteína fluorescente verde (<i>green fluorescent protein</i>)
GPER	Receptor de estrógeno acoplado a proteína G (<i>G protein-coupled estrogen receptor</i>)
HBSS	Solución salina equilibrada de Hank (<i>Hank's balanced salt solution</i>)
HCQ	Hidroxicloroquina
HFD	Dieta rica en grasa (<i>high fat diet</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hsp60	Proteína de choque térmico de 60 kDa (<i>heat shock protein 60</i>)
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 kDa (<i>heat shock protein 70</i>)
IL-1β	Interleuquina 1 β
IL-6	Interleuquina 6
LAMP-2A	Proteína de membrana asociada al lisosoma 2 (<i>lysosome-associated membrane protein 2</i>)
LC3	Cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos 1 (<i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>)
LC3-II	Proteína LC3 unida covalentemente a fosfatidiletanolamina
Let	4,4'-(1 <i>H</i> -1,2,4-Triazol-1-ilmetileno)bisbenzoniitrilo o letrozol
LIR	Región de interacción con LC3 (<i>LC3-interacting region</i>)
LPS	Lipopolisacárido
Map1lc3b	Gen de la cadena ligera 3B de la proteína asociada a microtúbulos 1A/1B (<i>microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B</i>)
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)propanosulfónico
MTCO1	Subunidad 1 de la citocromo c oxidasa
mTOR	Proteína diana de la rapamicina en mamíferos (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NDUFS1	Subunidad de 75 kDa de la NADH:ubiquinona oxidorreductasa
NPY	Neuropéptido Y
Nrf2	Factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2 (<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
PA	Ácido palmítico (<i>palmitic acid</i>)
PB	Tampón fosfato (<i>phosphate buffer</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PN	Postnatal
POMC	Proopiomelancortina
PPT	4,4',4''-(4-Propil-[1 <i>H</i>]-pirazol-1,3,5-triyl)trisfenol

Rap	Rapamicina
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
Rpl13a	Gen de la proteína L13a de la subunidad ribosomal 60S (<i>60S ribosomal protein L13a</i>)
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (<i>reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction</i>)
SCAF1	Factor de ensamblaje de supercomplejos 1 (<i>supercomplex assembly factor 1</i>)
SDHA	Subunidad A de la succinato deshidrogenasa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SNC	Sistema nervioso central
Sqstm1	Gen de la proteína de unión a ubiquitina p62 (también denominada <i>sequestosome-1</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α (<i>tumor necrosis factor α</i>)
TTBS	Solución salina tamponada con Tris que contiene Tween-20 (<i>Tween-Tris-buffered saline</i>)
Tun	Tunicamicina
ULK	Quinasa activadora de la autofagia tipo Unc-51 (<i>Unc-51 like autophagy activating kinase</i>)
UQCRC2	Proteína 2 del complejo ubiquinol-citocromo-c reductasa

Introducción

1. Regulación central del metabolismo

El cerebro posee un papel fundamental en el control metabólico del organismo gracias a su capacidad para detectar señales que informan del estado nutricional periférico. Entre estas señales, se encuentran la disponibilidad de nutrientes (como los niveles de ácidos grasos libres) o, las hormonas leptina e insulina. Estas hormonas actúan como señales de adiposidad, de forma que sus niveles circulantes son directamente proporcionales a la cantidad de tejido adiposo presente en el organismo (Seeley y Woods 2003). Cuando existe una amplia disponibilidad de nutrientes y/o niveles elevados de leptina e insulina, el cerebro inhibe la ingesta calórica y la producción de glucosa. Al mismo tiempo, incrementa el gasto energético y la formación de depósitos grasos (Schwartz y Porte 2005).

El hipotálamo es una de las regiones del cerebro más importantes para el control de la ingesta y del metabolismo energético. Esta función fue descubierta al observarse que la lesión de diferentes núcleos del hipotálamo producía cambios en la ingesta y el peso corporal (Anand y Brobeck 1951). Dentro del hipotálamo, el núcleo arcuato juega un papel fundamental en el control metabólico debido, en parte, a su localización. El arcuato está situado en la parte ventral del hipotálamo mediobasal, cerca de la eminencia media, una región rica en capilares fenestrados que permite la difusión pasiva de moléculas desde la sangre. Esta característica facilita el transporte de las hormonas y nutrientes circulantes, y su detección por las neuronas del arcuato. Gracias a ello, el arcuato puede integrar las señales metabólicas periféricas y las aferencias neuronales, generando una respuesta coordinada que permite regular el metabolismo (Timper y Brüning 2017, García-Cáceres *et al.* 2019).

En el arcuato se distinguen dos poblaciones neuronales con efectos antagónicos: neuronas NPY/AgRP y neuronas POMC. Las primeras coexpresan el neuropéptido Y (NPY) y la proteína r-agoutí (AgRP, del inglés *agouti-related protein*), los cuales estimulan el apetito (orexigénicos). El ayuno favorece la activación de dicha población neuronal, lo que promueve la ingesta y reduce el gasto energético. Las neuronas POMC expresan el precursor proopiomelanocortina (POMC), a partir del que se forma la hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH, del inglés *α -melanocyte-stimulating hormone*). Ambos péptidos presentan propiedades inhibitoras del apetito (anorexigénicos). Las neuronas POMC se activan tras la ingesta, lo que permite la sensación de saciedad y promueve el gasto energético (Waterson y Horvath 2015, García-Cáceres *et al.* 2019).

A pesar de la importancia del núcleo arcuato en el control del metabolismo, otras regiones hipotalámicas también intervienen en él, así como diversos núcleos del tronco encefálico y

componentes del sistema mesolímbico. Estas señales se integran con la información de los centros de toma de decisiones, generándose una respuesta coordinada de la ingesta, el metabolismo de la glucosa y la regulación de la homeostasis energética (Waterson y Horvath 2015, Timper y Brüning 2017).

2. Papel metabólico de los astrocitos

Los astrocitos son el tipo celular más abundante del sistema nervioso central (SNC). Durante décadas se creyó que su función era dar soporte físico y metabólico a las neuronas. Sin embargo, en los últimos tiempos se ha comprobado que los astrocitos intervienen en numerosas funciones del SNC debido, en parte, a la enorme heterogeneidad de este tipo celular. Los astrocitos se encargan del mantenimiento de la barrera hematoencefálica, y del transporte de metabolitos y nutrientes a través de ella. Además, intervienen en la formación de las sinapsis y la modulación de su actividad. A nivel energético, los astrocitos son las células encargadas de almacenar energía en forma de glucógeno. Junto a estas funciones, intervienen en la defensa antioxidante y en la respuesta ante una lesión en el SNC (Freire-Regatillo *et al.* 2017, Verkhratsky y Nedergaard 2017, Miller 2018).

Aunque se han descrito en profundidad los circuitos neuronales implicados en el control metabólico del organismo, los astrocitos también presentan un papel esencial en este proceso. Los astrocitos expresan receptores para diversas hormonas que regulan el metabolismo como son la insulina, la leptina y el estradiol (Diano *et al.* 1998, Azcoitia *et al.* 1999, Milner *et al.* 2001, Kuo, Hamid, Bondar, Prossnitz, *et al.* 2010, Hernandez-Garzón *et al.* 2016). El tratamiento con leptina e insulina modula la función de los astrocitos, modificando la captura de glucosa y glutamato, y la liberación de ATP (Fuente-Martín *et al.* 2012, Hernandez-Garzón *et al.* 2016, Cai *et al.* 2018). Además, el estradiol protege a los astrocitos frente a la inflamación (Acaz-Fonseca *et al.* 2014), un proceso asociado a alteraciones metabólicas como la obesidad.

Las funciones metabólicas de los astrocitos presentan una repercusión sistémica como se demuestra al eliminar los receptores de leptina e insulina específicamente en este tipo celular. Así, la delección del receptor de leptina en los astrocitos modifica los circuitos neuronales hipotalámicos y altera los patrones de ingesta (Kim *et al.* 2014). En el caso de la delección del receptor de insulina, se altera el metabolismo sistémico de la glucosa (García-Cáceres *et al.* 2016). Por tanto, los astrocitos juegan un papel esencial en el control metabólico del organismo.

3. Obesidad

La obesidad se ha convertido en una epidemia global en las últimas décadas, ya que su prevalencia casi se ha triplicado entre los años 1975 y 2016 (Organización Mundial de la Salud 2018). La obesidad surge al alterarse el balance energético del organismo, de manera que la ingesta calórica supera al gasto energético. Esto genera una situación de balance energético positivo que induce una acumulación anormal o excesiva de grasa (Hruby y Hu 2015).

La obesidad está asociada a una reducción de la esperanza de vida e incrementa el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, diabetes, ictus, trastornos musculares y algunos tipos de cáncer, entre otros trastornos (Fruh 2017). Junto a estas alteraciones, diversos estudios sugieren una relación de la obesidad con el declive cognitivo y la demencia. A nivel estructural, existe una correlación entre un elevado índice de masa corporal (parámetro asociado al sobrepeso y la obesidad), y una disminución del volumen cerebral en adultos y de materia gris en ancianos (Ward *et al.* 2005, Raji *et al.* 2010). Respecto a la función cerebral, el sobrepeso y la obesidad se correlacionan con una peor función ejecutiva y una reducción de la actividad en las áreas implicadas en la memoria (Gunstad *et al.* 2007, Cheke *et al.* 2017). Además, la obesidad durante la etapa adulta es considerada un factor de riesgo en la enfermedad de Alzheimer (Kivipelto *et al.* 2005, Profenno *et al.* 2010). Concretamente, la presencia de un elevado índice de masa corporal en la etapa adulta se asocia a una mayor acumulación de β -amiloide en el cerebro durante la vejez (Gottesman *et al.* 2017).

3.1. Modelos animales de obesidad

A pesar de la relación existente entre la obesidad y las alteraciones cognitivas, los mecanismos moleculares que median esta relación se desconocen con exactitud. Esto se debe a la gran complejidad del fenómeno de la obesidad, en el que intervienen tanto factores genéticos como ambientales que interaccionan entre sí (Hruby y Hu 2015). Por este motivo, se han desarrollado modelos animales de obesidad que facilitan el estudio de los mecanismos implicados en esta enfermedad. Existen dos tipos de modelos animales de obesidad, genéticos e inducidos por dieta, que son elegidos en función del objetivo del estudio. Mientras que los modelos de obesidad inducida por dieta imitan mejor la fisiopatología humana de la obesidad, los modelos genéticos se emplean para caracterizar la contribución de un gen específico en el desarrollo de la obesidad (Lutz y Woods 2012, Barrett *et al.* 2016).

Los modelos de obesidad inducida por dieta se basan en la administración de una dieta rica en grasa (HFD, del inglés *high fat diet*), aunque también se emplean dietas ricas en azúcares. Estos

animales se caracterizan por la presencia de diversas alteraciones metabólicas como el incremento del peso corporal, la acumulación del tejido adiposo y la resistencia a la insulina (Montgomery *et al.* 2013, Gao *et al.* 2015). Junto con estos efectos periféricos, también se han descrito alteraciones en el SNC asociadas al consumo de este tipo de dieta. Por ejemplo, se produce una alteración de la barrera hematoencefálica (de Aquino *et al.* 2019) y un incremento del estrés oxidativo (Morrison *et al.* 2010). Además, se reducen los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) junto con la densidad de las espinas dendríticas, lo que está asociado a una alteración de la memoria espacial (Molteni *et al.* 2002, Stranahan *et al.* 2008).

3.2. Papel de la inflamación en la obesidad

Uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes en la obesidad es la inflamación. Esta relación fue descrita por primera vez a nivel periférico al descubrirse que existía un incremento de la expresión del factor de necrosis tumoral α (TNF- α , del inglés *tumor necrosis factor α*) en el tejido adiposo de ratones y humanos obesos. Posteriormente se describió que el consumo de HFD también induce una respuesta inflamatoria en el hipotálamo de ratones y humanos (De Souza *et al.* 2005, Thaler *et al.* 2012). Concretamente, la producción de citoquinas proinflamatorias en el hipotálamo se observa tan sólo un día después de consumir este tipo de dieta. Por tanto, el proceso inflamatorio precede a otras alteraciones asociadas a la obesidad como la ganancia de peso (Thaler *et al.* 2012). Aparte del hipotálamo, también se ven afectadas otras regiones del SNC como son el hipocampo o la amígdala (Almeida-Suhett *et al.* 2017).

Los astrocitos juegan un papel esencial en el proceso inflamatorio asociado a la obesidad. Tras el consumo de HFD, se produce un incremento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *glial fibrillary acidic protein*), un marcador de astrocitos. Además, se producen cambios morfológicos propios de una morfología reactiva en los astrocitos (Thaler *et al.* 2012). Estos cambios morfológicos se encuentran asociados a una modificación de los circuitos neuronales del hipotálamo. De esta forma, tras el consumo de HFD se incrementa la cobertura glial de las neuronas POMC, disminuyendo el número de sinapsis en esta población neuronal (Horvath *et al.* 2010). Como consecuencia de ello, se produce un incremento de la actividad de las neuronas POMC y una menor activación de las neuronas NPY, lo que podría ser un mecanismo compensatorio para impedir una mayor ganancia de peso corporal. Además, la respuesta inflamatoria continuada de los astrocitos es responsable de las alteraciones metabólicas asociadas al consumo de HFD (Douglass *et al.* 2017, Zhang *et al.* 2017).

3.3. Impacto de los ácidos grasos saturados en el cerebro

Junto con la respuesta inflamatoria, la obesidad se caracteriza por la alteración del perfil lipídico en sangre, produciéndose un incremento de los niveles de ácidos grasos libres circulantes (Franssen *et al.* 2011, Arner y Rydén 2015). Los ácidos grasos circulantes pueden atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que alcanzan el cerebro y pasan a formar parte de los lípidos de este tejido (Smith y Nagura 2001). Debido a ello, el consumo de HFD genera una acumulación de ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (PA, del inglés *palmitic acid*) en el cerebro de roedores (Morselli *et al.* 2014, Valdearcos *et al.* 2014). Además, los pacientes con síndrome metabólico muestran una mayor incorporación de ácidos grasos libres en el cerebro (Karmi *et al.* 2010).

La alteración de los niveles de PA en el cerebro no sólo se encuentra asociada a la obesidad, sino que también ha sido descrita en enfermedades neurodegenerativas o trastornos mentales. Por ejemplo, existen niveles elevados de PA en la corteza parietal de pacientes de enfermedad de Alzheimer (Fraser *et al.* 2010) y en las balsas lipídicas corticales de pacientes de Parkinson (Fabelo *et al.* 2011). Además, los pacientes con depresión muestran un incremento en los niveles de PA de la corteza entorrinal y la amígdala (Hamazaki *et al.* 2012, 2013).

Los resultados de estos estudios demuestran que la desregulación de los niveles de PA en el SNC está relacionada con diversas condiciones patológicas (Hussain *et al.* 2013). Sin embargo, los mecanismos que median el efecto fisiopatológico de un exceso de PA en el cerebro no se conocen con exactitud. Para facilitar este estudio, se ha desarrollado un modelo *in vitro* que consiste en el tratamiento con PA de los diferentes tipos celulares del cerebro.

Debido al importante papel de los astrocitos en la regulación del metabolismo y su capacidad para metabolizar los ácidos grasos (Edmond *et al.* 1987, Blázquez *et al.* 2000), es interesante determinar los efectos del PA en este tipo celular. Se ha visto que el tratamiento con PA disminuye la captación de glucosa y la liberación de lactato de los astrocitos (Patil *et al.* 2007). Además, incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias (Gupta *et al.* 2012, Morselli *et al.* 2014) y especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) en los astrocitos (Wong *et al.* 2014, González-Giraldo *et al.* 2018). Como consecuencia de estos cambios, el PA induce apoptosis y disminuye la viabilidad celular de los astrocitos (Wang *et al.* 2012, Wong *et al.* 2014).

4. Autofagia

4.1. Definición y tipos de autofagia

La autofagia es un proceso catabólico que permite la degradación del material citoplasmático mediante la acción de los lisosomas en mamíferos, y la vacuola en plantas y levaduras. Como se puede ver en la Figura 1, se distinguen tres tipos de autofagia en función de la forma en la que los componentes citoplasmáticos son dirigidos al lisosoma (Boya *et al.* 2013, Galluzzi *et al.* 2017, Mizushima 2018).

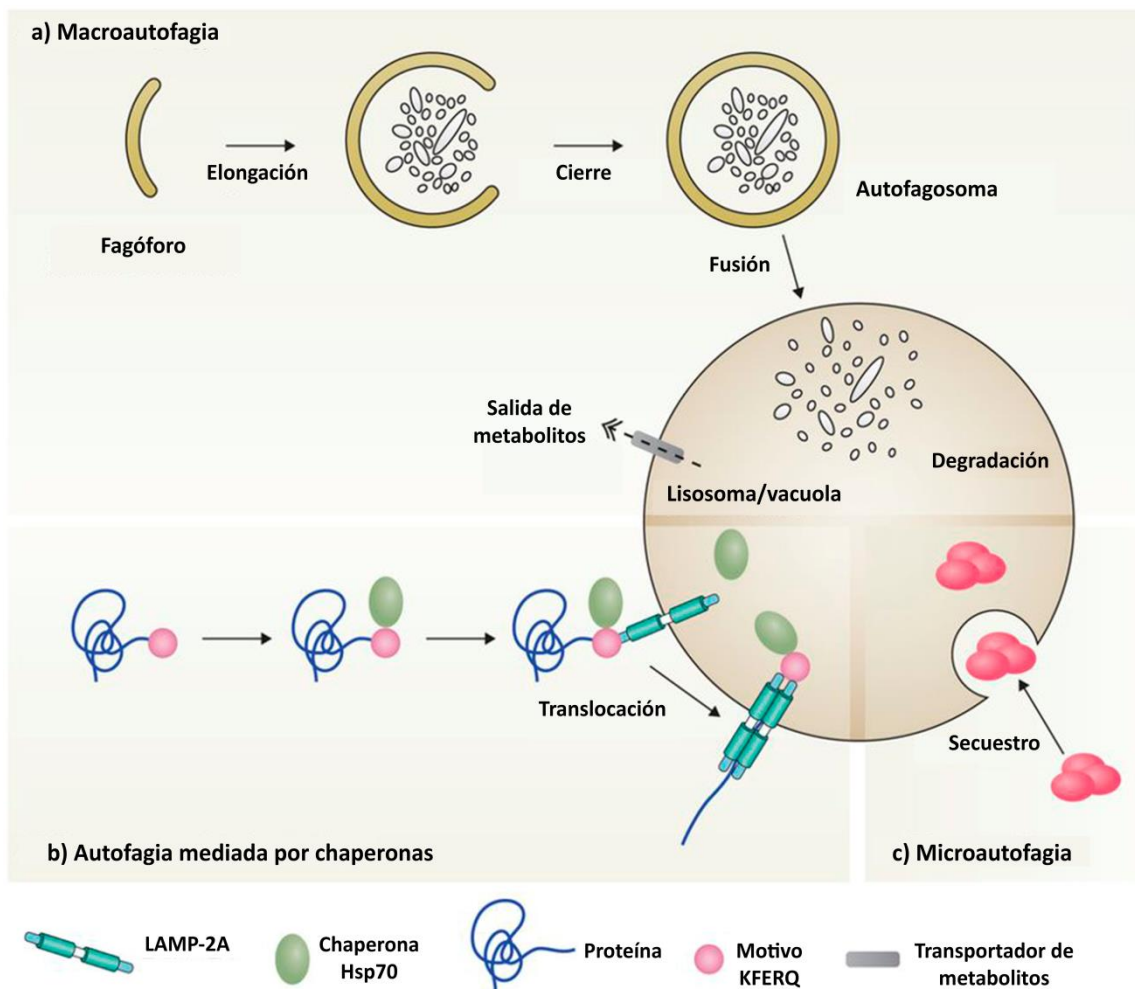


Figura 1. Tipos de autofagia. a) La macroautofagia se caracteriza por la formación de vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas que dirigen el contenido citoplasmático al lisosoma para su degradación. b) En la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas se unen a chaperonas y se translocan al interior del lisosoma al ser reconocidas por la proteína de membrana asociada al lisosoma 2A (LAMP-2A, del inglés *lysosome-associated membrane protein 2A*). c) En la microautofagia, los componentes citoplasmáticos son secuestrados directamente por el lisosoma. Adaptada de Boya, Reggiori y Codogno (2013).

La macroautofagia permite la degradación de grandes porciones del citoplasma mediante la formación de una estructura membranosa denominada fagóforo. El fagóforo se elonga hasta formar

una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma. A continuación, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma, dando lugar al autofagolisosoma, en el que se digieren los componentes citoplasmáticos. En la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas que deben ser degradadas son dirigidas directamente al lisosoma. Este mecanismo es selectivo, pues sólo se degradan aquellas proteínas que presentan una secuencia específica de aminoácidos (motivo KFERQ). Esta secuencia permite su reconocimiento por chaperonas del citosol, como la proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp70, del inglés *heat shock protein 70*), que las transportan hasta la superficie del lisosoma. Allí se unen a la proteína LAMP-2A, que se encarga de su translocación al interior del lisosoma, donde se degradan. Por último, la microautofagia es el tipo de autofagia menos estudiado. En ella, los componentes a degradar son secuestrados directamente por el lisosoma a través de invaginaciones de su membrana. En los mamíferos, esta función es llevada a cabo por los endosomas tardíos en vez de los lisosomas.

La macroautofagia es el tipo de autofagia mejor caracterizado, por lo que nos centraremos en este tipo de autofagia. A partir de ahora nos referiremos a ella simplemente como “autofagia”.

En el proceso de autofagia participan un conjunto de proteínas conocidas como proteínas relacionadas con la autofagia (ATG, del inglés *AuTophagy-related*), que fueron caracterizadas por primera vez en levaduras (Tsukada y Ohsumi 1993). Estas proteínas se encuentran muy conservadas a nivel evolutivo, lo que ha permitido extender su estudio a otros organismos (Mizushima 2018). Durante la formación de los autofagosomas intervienen 16-20 proteínas ATG que se agrupan en base a sus funciones en este proceso, como se indica en la Figura 2 (Mizushima *et al.* 2011, Levine y Kroemer 2019):

1. Complejo ULK: al inducirse la autofagia, este complejo se transloca al lugar de formación del autofagosoma. La quinasa activadora de la autofagia tipo Unc-51 (ULK, del inglés *Unc-51 like autophagy activating kinase*) presenta una función quinasa de serina-treonina y fosforila a numerosos factores que intervienen en la señalización posterior.
2. Complejos fosfoinositol-3-quinasa de clase III: se encargan de la producción de fosfatidilinositol-3-fosfato, imprescindible para la formación del autofagosoma.
3. Sistemas de conjugación ATG12 y LC3: permiten la expansión del fagóforo y su cierre, para dar lugar al autofagosoma. A partir del sistema de conjugación ATG12, se forma el complejo ATG12-ATG5-ATG16L, que se localiza en la parte exterior del fagóforo y permite su elongación. El sistema de conjugación de la cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos 1 (LC3, del inglés *microtubule-associated protein 1 light chain 3*) permite la unión covalente de LC3 al grupo amino del fosfolípido de membrana

fosfatidiletanolamina (LC3-II). Esta reacción es facilitada por el complejo ATG12-ATG5-ATG16L. LC3-II se localiza en la membrana interna y externa del autofagosoma, e interviene tanto en la elongación del fagóforo como en su cierre para formar el autofagosoma. A diferencia del complejo ATG12-ATG5-ATG16L, LC3-II se mantiene unido a la membrana del fagóforo y del autofagosoma hasta la fusión con el lisosoma. Por este motivo, LC3-II es un marcador muy útil para monitorizar la autofagia (Kabeya *et al.* 2000).

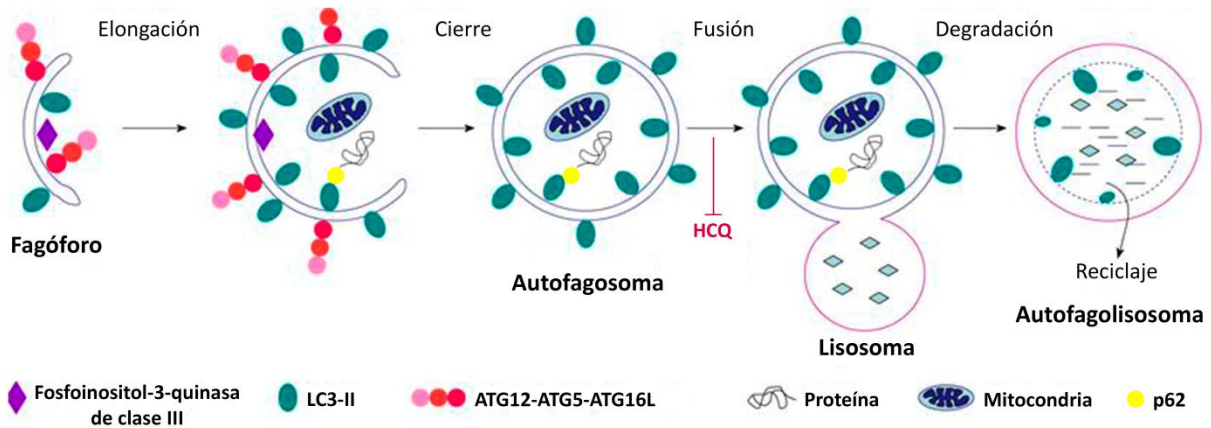


Figura 2. Fases de formación del autofagosoma y proteínas implicadas. El proceso de autofagia se inicia con la formación del fagóforo, que se elonga y rodea el material citoplasmático que va a ser degradado. Entre este material se encuentran orgánulos como las mitocondrias y proteínas, los cuales pueden degradarse de manera selectiva gracias a la presencia de receptores de autofagia como la proteína de unión a ubiquitina p62. Al cerrarse el fagóforo se forma el autofagosoma, que madura hasta fusionarse con el lisosoma. Como consecuencia de esta fusión se forma el autofagolisosoma, en el que se degradan los componentes citoplasmáticos mediante la acción de las enzimas lisosomales. Los productos resultantes de la degradación son reciclados por la célula. La hidroxiclороquina (HCQ) es un inhibidor lisosomal que bloquea la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. Adaptada de Abounit, Scarabelli y McCauley (2012).

4.2. Autofagia selectiva

Inicialmente se creía que los componentes citoplasmáticos degradados mediante autofagia eran seleccionados de manera aleatoria. Sin embargo, en los últimos años se han descrito mecanismos selectivos de autofagia que permiten la degradación específica de agregados proteicos, y orgánulos dañados o innecesarios. Entre los orgánulos que se degradan mediante este tipo de respuesta se encuentran las mitocondrias, los peroxisomas, los lisosomas, el retículo endoplásmico y el núcleo (Gatica *et al.* 2018).

La degradación selectiva es posible gracias a la presencia de una región de interacción con LC3 (LIR, del inglés *LC3-interacting region*) en el sustrato, que permite la unión del sustrato al autofagosoma para su degradación. En otros casos, los sustratos reclutan a receptores autofágicos

como p62, los cuales contienen LIR, y permiten la interacción del sustrato y el receptor con el autofagosoma (Mizushima 2018). Junto a estos mecanismos, la ubiquitinación también juega un papel muy importante en las respuestas selectivas de autofagia. p62 y otros receptores autofágicos son capaces de unirse a la ubiquitina, de manera que las proteínas ubiquitinadas pueden ser degradadas mediante autofagia (Gatica *et al.* 2018). Por tanto, la ubiquitina no sólo participa en la degradación proteica mediante el sistema del proteasoma, sino que también lo hace en la autofagia selectiva. Además, los mecanismos de degradación por el proteasoma y la autofagia están conectados entre sí, de forma que la inhibición del proteasoma favorece la actividad autofágica como mecanismo compensatorio y viceversa (Ji y Kwon 2017).

4.3. Funciones de la autofagia

La autofagia es un proceso fundamental a nivel fisiológico. En condiciones basales (presencia de nutrientes), la autofagia interviene en el recambio de los componentes citoplasmáticos. Este es un aspecto esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular, ya que permite la eliminación de proteínas y orgánulos que están dañados o son innecesarios. Además, en situaciones de ayuno o ante la necesidad de un aporte energético adicional, la autofagia actúa como un mecanismo de obtención de nutrientes. De esta forma, la adaptación al ayuno supone la función más conservada de la autofagia entre los distintos organismos. Debido a que la autofagia interviene en funciones esenciales para el mantenimiento celular, se encuentra implicada en multitud de procesos como son la diferenciación celular, el desarrollo, la supresión de tumores, la respuesta inmune, el envejecimiento y la muerte celular (Boya *et al.* 2013, Mizushima 2018).

La delección de genes esenciales en el proceso de autofagia (como Atg5 o Atg7) en el SNC induce retraso en el crecimiento, alteraciones del comportamiento, déficits motores y neurodegeneración prematura. Además, dichos cambios se encuentran asociados a una acumulación de agregados proteicos (Hara *et al.* 2006, Komatsu *et al.* 2006). Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de la autofagia en el SNC, especialmente para las neuronas, que son células postmitóticas. En ellas, la autofagia presenta un papel fundamental en el recambio de orgánulos celulares y la eliminación de los agregados proteicos que aparecen con el envejecimiento (Jaeger y Coray 2009, Nikolettou *et al.* 2015).

A pesar de las importantes funciones de los astrocitos en el SNC, el papel de la autofagia en ellos no ha sido tan estudiado como en las neuronas. Se ha descrito que la autofagia es un mecanismo esencial para la remodelación mitocondrial que se produce en respuesta a un estímulo inflamatorio en los astrocitos (Motori *et al.* 2013). Además, el defecto de la autofagia en astrocitos (mediado por una alteración lisosomal) induce la degeneración de las neuronas corticales (Di Malta

et al. 2012). Por último, la inducción del flujo de autofagia en los astrocitos disminuye el área de infarto e incrementa la supervivencia neuronal en un modelo de isquemia (Liu, Tian, *et al.* 2018). Estos resultados demuestran la importancia de la autofagia en los astrocitos para el correcto funcionamiento del SNC.

4.4. Papel de la autofagia en la regulación energética

Diversos estudios han demostrado que la autofagia interviene en la regulación central del metabolismo. En el núcleo arcuato, la autofagia se encuentra activa de manera basal (Meng y Cai 2011, Coupé *et al.* 2012) y desempeña funciones esenciales en las neuronas AgRP y POMC. En las neuronas AgRP, la autofagia permite la movilización de lípidos neuronales y la producción del péptido AgRP en situaciones de ayuno (Kaushik *et al.* 2011). La inhibición específica de la autofagia en las neuronas POMC induce un incremento del peso corporal y de la adiposidad, fenómenos asociados a una disminución en la producción de α -MSH (Kaushik *et al.* 2012) y a la resistencia a la acción de la leptina (Quan *et al.* 2012). Además, se produce una alteración de las proyecciones axonales de las neuronas POMC, lo que demuestra la importancia de la autofagia para el desarrollo normal de este tipo neuronal (Coupé *et al.* 2012). Aparte de estas funciones, la autofagia hipotalámica regula la actividad autofágica de tejidos periféricos como la grasa parda y el hígado. Concretamente, la activación de la autofagia en las neuronas POMC favorece la movilización de los lípidos en estos tejidos mediante lipofagia (Martinez-Lopez *et al.* 2016).

La administración de HFD de manera crónica disminuye la autofagia en el hipotálamo de roedores (Meng y Cai 2011, Ignacio-Souza *et al.* 2014, Portovedo *et al.* 2015). Esta disminución se encuentra asociada a una reducción de la autofagia selectiva de las mitocondrias y los lípidos en el hipotálamo (Morselli *et al.* 2015). Junto a estos cambios, el bloqueo de la autofagia en las neuronas POMC exacerba los efectos de la HFD, disminuyendo la movilización del tejido adiposo en condiciones de ayuno y empeorando la homeostasis de la glucosa (Kaushik *et al.* 2012, Quan *et al.* 2012). Además, se ha descrito una reducción del flujo de autofagia en neuronas hipotalámicas en el modelo *in vitro* de tratamiento con PA.

Los estudios anteriores muestran la importancia de la autofagia neuronal en el control metabólico y su alteración tras el consumo de una HFD. A pesar del papel fundamental que tienen los astrocitos en la regulación metabólica, no se ha descrito el papel de la autofagia en esta función. Además, se desconoce con detalle el impacto concreto que la HFD puede tener sobre la autofagia de los astrocitos. En relación a ello, lo único que se ha descrito es que el consumo crónico de HFD induce un aumento de LC3 en los astrocitos del hipocampo (Chen *et al.* 2018).

4.5. Regulación de la autofagia mediante el ayuno

El ayuno es el mecanismo inductor de autofagia mejor caracterizado y se encuentra regulado por dos de las principales quinasas que controlan el metabolismo celular: la proteína diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR, del inglés *mammalian target of rapamycin*) y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, del inglés *AMP-activated protein kinase*) (Figura 3).

mTOR es una quinasa con un papel esencial en el crecimiento, la proliferación y el metabolismo celular. En situaciones de abundancia de nutrientes, mTOR se encuentra activado. Como consecuencia de ello, promueve la síntesis de proteínas e inhibe la autofagia (Singh y Cuervo 2011). Para inhibir la autofagia, mTOR fosforila en determinados residuos a ULK1 y ATG13 (proteínas del complejo de iniciación de la autofagia). De esta manera, inhibe la actividad quinasa de ULK1 e impide la inducción de la autofagia. Cuando se produce un déficit de nutrientes, mTOR se inhibe y esto hace que ULK1 y ATG13 se desfosforilen en dichos residuos inhibitorios. Como consecuencia de ello, ULK1 se activa mediante autofosforilación y fosforila a otros componentes del complejo de iniciación como ATG13 y la proteína de interacción con la familia de la quinasa FAK de 200 kDa (FIP200, del inglés *FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa*), activándose la autofagia (Jung *et al.* 2009).

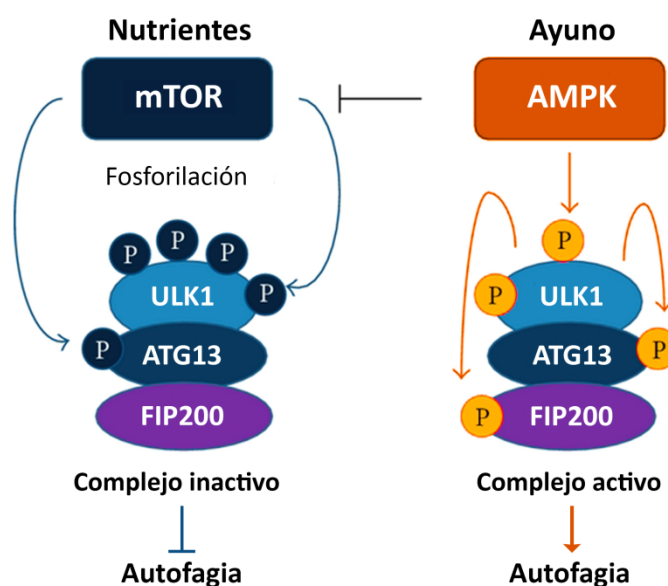


Figura 3. Regulación de la autofagia mediante mTOR y AMPK en función del estado nutricional. En presencia de nutrientes, mTOR fosforila a las proteínas del complejo de iniciación de la autofagia ULK1 y ATG13, inactivándolas e inhibiendo la autofagia. En condiciones de ayuno o tras la activación de AMPK, mTOR se inhibe, y ULK1 y ATG13 se desfosforilan en sus residuos inhibitorios. Además, ULK1 puede autofosforilarse o ser fosforilado directamente por AMPK en residuos diferentes a los que fosforila mTOR. Esto induce la activación de ULK1, que activa a otros componentes del complejo de iniciación de la autofagia como ATG13 y FIP200, induciéndose la autofagia. Adaptada de Yamahara *et al.* (2013).

La autofagia también puede inducirse ante la disminución de las reservas energéticas, una situación asociada a la reducción del ratio ATP:ADP. En estas condiciones, se produce la activación de AMPK, una proteína que controla el estatus energético de la célula. Esta proteína, además de inhibir a mTOR, puede fosforilar de forma directa a ULK1, activándolo e induciendo la autofagia (Kim *et al.* 2011).

5. Organización mitocondrial

Una de las funciones más importantes de la mitocondria es la producción de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa. En este proceso intervienen las proteínas que forman la cadena transportadora de electrones (complejos mitocondriales I-IV) y la ATP sintasa, localizadas en la membrana mitocondrial interna (Tabla 1). La cadena transportadora de electrones transfiere electrones desde el NADH (complejo I) o el FADH₂ (complejo II) hasta el oxígeno, a la vez que bombea protones a través de la membrana mitocondrial interna (excepto el complejo II). Como consecuencia, se crea un gradiente electroquímico que permite la formación de ATP por parte de la ATP sintasa.

Complejo mitocondrial	Nombre alternativo
I	NADH:ubiquinona oxidorreductasa
II	Succinato deshidrogenasa
III	Ubiquinol-citocromo-c reductasa
IV	Citocromo c oxidasa
V	ATP sintasa

Tabla 1. Nombre alternativo empleado para identificar los diferentes complejos mitocondriales.

Para explicar la organización de los complejos mitocondriales en la membrana mitocondrial interna se han propuesto dos modelos alternativos: el modelo sólido y el modelo fluido. En el modelo sólido, se postulaba que los complejos mitocondriales se agrupan en una estructura supramolecular rígida que aumenta la eficiencia del transporte de electrones (Keilin y Hartree 1974). Sin embargo, este modelo fue sustituido progresivamente por el modelo fluido, que proponía que los complejos mitocondriales se mueven libremente en la membrana mitocondrial. La transferencia de electrones se produce al colisionar de manera aleatoria y transitoria los complejos mitocondriales I-IV y los transportadores móviles de electrones, ubiquinona y citocromo c (Hackenbrock *et al.* 1986). Este modelo era el aceptado hasta que se describió que los complejos mitocondriales se asocian entre sí de manera estable, hecho que apoya el modelo sólido (Schägger y Pfeiffer 2000). Concretamente, se observó que los complejos I, III y IV migran juntos cuando las proteínas mitocondriales son separadas mediante electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida (BN-PAGE, del inglés *blue native polyacrilamide gel electrophoresis*). A raíz de este descubrimiento, se propuso que los complejos

mitocondriales se agrupaban en estructuras superiores denominadas supercomplejos, los cuales favorecerían un transporte electrónico más eficiente. Sin embargo, ni el modelo sólido ni el fluido puede explicar por sí solo todas las características del transporte electrónico que se han demostrado a lo largo de los años. Por este motivo, en la actualidad se propone un modelo plástico en el que coexisten en la mitocondria tanto complejos libres como supercomplejos según las condiciones celulares (Acín-Pérez *et al.* 2008, Lapuente-Brun *et al.* 2013).

A partir de lo propuesto en el modelo plástico, los supercomplejos se corresponden con estructuras supramoleculares formadas por los complejos I, III y IV (Figura 4). La participación del complejo II en la formación de los supercomplejos es un aspecto controvertido. Inicialmente se describió que parte del complejo II se encontraba asociado a los supercomplejos (Acín-Pérez *et al.* 2008). Sin embargo, posteriormente se ha comprobado que este complejo no interacciona con el resto de complejos mitocondriales (Kovářová *et al.* 2013). A su vez, la ATP sintasa se organiza formando dímeros que participan en la formación de las crestas mitocondriales y favorecen la producción de ATP (Jonckheere *et al.* 2012).

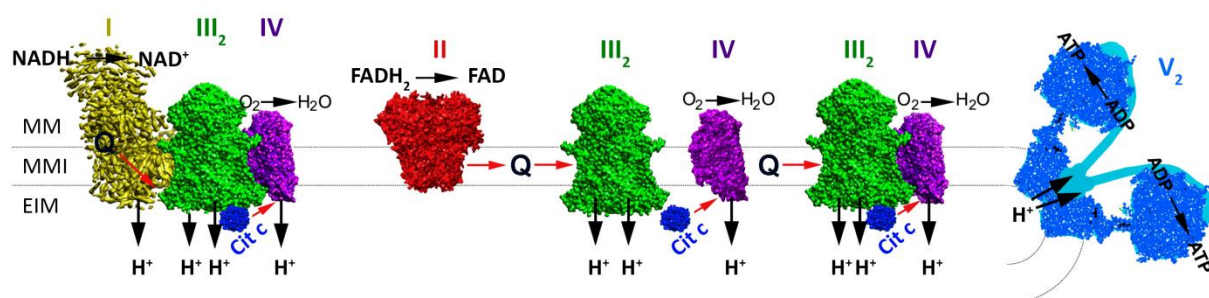


Figura 4. Modelo plástico de organización de la cadena transportadora de electrones. A excepción del complejo II, parte de los complejos I, III y IV se agrupan formando supercomplejos en la membrana mitocondrial interna (MMI). El complejo II transporta electrones a través de la ubiquinona (Q) al complejo III que no está unido al complejo I. El citocromo c (cit c) se encarga de transportar electrones entre el complejo III y IV. Por último, la ATP sintasa (complejo V) sintetiza ATP a partir de ADP gracias a la existencia del gradiente de protones generado por los complejos I, III y IV. Las flechas rojas muestran el flujo de electrones. Se indican la posición del espacio intermembrana (EIM) y la matriz mitocondrial (MM). Adaptada de Chaban, Boekema y Dudkina (2014).

El contenido en lípidos de la membrana mitocondrial regula la formación y estabilidad de los supercomplejos. La cardiolipina, un fosfolípido característico de las mitocondrias, interviene en la estabilización de los supercomplejos en levaduras (Pfeiffer *et al.* 2003). Además, se ha descrito que los pacientes con síndrome de Barth (en el que existe un defecto en el proceso de remodelación de la cardiolipina) presentan una disminución de los supercomplejos mitocondriales (McKenzie *et al.* 2006). Junto con el contenido en cardiolipina de la membrana mitocondrial, existen factores

proteicos que intervienen en el ensamblaje de los complejos mitocondriales para formar los supercomplejos. Entre estos factores destaca el factor de ensamblaje de supercomplejos 1 (SCAF1, del inglés *supercomplex assembly factor 1*), que modula la interacción entre los complejos III y IV. Este factor posee dos isoformas, una corta y otra larga, que difieren en su funcionalidad. Mientras que los ratones de la cepa C57BL/6J presentan la isoforma corta y no forman supercomplejos entre los complejos III y IV, los ratones de la cepa CD1 poseen la isoforma larga que permite la formación de dichos supercomplejos (Lapuente-Brun *et al.* 2013).

La organización de los complejos mitocondriales en supercomplejos se ha asociado con numerosas funciones como el incremento de la estabilidad de los complejos mitocondriales y la eficiencia respiratoria, así como la disminución de la producción de ROS (Genova y Lenaz 2014). En el SNC, se ha descrito que las neuronas y los astrocitos presentan diferencias en su organización mitocondrial en supercomplejos. Los astrocitos poseen una mayor cantidad de complejo I libre que las neuronas, lo que está asociado a una mayor producción de ROS por parte de los astrocitos (Lopez-Fabuel *et al.* 2016). Sin embargo, todavía se desconocen muchos aspectos relacionados con la función y la estructura de los supercomplejos.

6. Diferencias sexuales en la respuesta metabólica

Existen diferencias sexuales en la prevalencia de las enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad, siendo mayor en los hombres que en las mujeres antes de la menopausia. Parte de estas diferencias se deben a que la distribución de la grasa corporal es distinta entre ambos sexos. Los hombres acumulan mayor cantidad de grasa visceral, mientras que en las mujeres predomina la grasa subcutánea antes de la menopausia. Debido a que la grasa visceral está asociada a un incremento en el riesgo de enfermedades metabólicas, los hombres son más susceptibles a sufrir este tipo de complicaciones (Palmer y Clegg 2015).

En los modelos animales de obesidad también se ha descrito la presencia de diferencias sexuales. En general, los machos son más susceptibles al incremento de peso y las alteraciones del metabolismo de la glucosa inducidos por una HFD crónica (Grove *et al.* 2010, Pettersson *et al.* 2012, Dorfman *et al.* 2017). No sólo se han encontrado diferencias sexuales a nivel metabólico, sino también en el SNC. Se ha descrito que el consumo de HFD induce inflamación únicamente en el hipotálamo de los machos (Morselli *et al.* 2014). Además, se produce una mayor acumulación de ácidos grasos saturados como el PA en machos que en hembras, tras el consumo de este tipo de dieta (Morselli *et al.* 2014, Rodríguez-Navas *et al.* 2016). La presencia de diferencias sexuales asociadas al consumo de HFD también se ha replicado *in vitro*, donde el tratamiento con PA induce

una mayor respuesta inflamatoria en los astrocitos de los machos que de las hembras (Morselli *et al.* 2014).

La existencia de diferencias en los niveles circulantes de estrógenos contribuye a la respuesta sexodimórfica de la obesidad. Tras la menopausia, se produce un cambio en la distribución de la grasa corporal en las mujeres y se incrementan los depósitos de grasa visceral. Este aspecto se encuentra asociado a un aumento en el riesgo de padecer enfermedades metabólicas, que alcanza los niveles de riesgo de los hombres (Palmer y Clegg 2015). De esta forma, los estrógenos regulan la distribución de la grasa corporal. Además, en modelos animales se ha comprobado que la privación de estrógenos mediante ovariectomía induce un incremento del peso corporal y la adiposidad (McElroy y Wade 1987). La administración de estradiol revierte el incremento de grasa visceral en las hembras ovariectomizadas al restaurar la sensibilidad a la insulina (Clegg *et al.* 2006). Además, las diferencias sexuales descritas tras el consumo de HFD desaparecen si las hembras son ovariectomizadas (Hong *et al.* 2009). Estos estudios ponen de manifiesto el importante papel del estradiol como regulador metabólico.

Parte de los efectos del estradiol en el metabolismo están mediados por las acciones de esta hormona en el cerebro, donde actúa a través de los receptores de estrógeno (ER, del inglés *estrogen receptor*) α y β , y del ER acoplado a proteína G (GPER, del inglés *G protein-coupled estrogen receptor*) (Arevalo *et al.* 2015). Cuando se elimina el ER α de forma específica en el hipotálamo ventromedial, se producen alteraciones en el metabolismo de la glucosa y obesidad (Musatov *et al.* 2007), lo que demuestra el papel del estradiol en el control energético central. Respecto al ER β , también se ha descrito que puede participar en este proceso de señalización, pero los resultados obtenidos no son tan claros. Por este motivo se cree que el ER α presenta un papel dominante en la función metabólica del estradiol. Además, se desconoce la función del GPER en este proceso debido a la escasez de estudios respecto a ello (Mauvais-Jarvis *et al.* 2013, Morselli *et al.* 2018).

La función mitocondrial también es esencial para el metabolismo celular y existen diferencias sexuales en ella. En general, las mitocondrias del cerebro de las hembras presentan una mayor funcionalidad y un menor estrés oxidativo que las de los machos (Borrás *et al.* 2003, Guevara *et al.* 2011). Además, existen diferencias sexuales en la composición de la cardiolipina de las mitocondrias corticales tras el nacimiento (Acaz-Fonseca *et al.* 2017). Debido a todo ello, también se han descrito diferencias sexuales en enfermedades que cursan con una disfunción mitocondrial como son las enfermedades neurológicas (Demarest y McCarthy 2015, Ventura-Clapier *et al.* 2017). Una parte de estas diferencias sexuales podría ser explicada por el efecto del estradiol, que ejerce acciones protectoras en situaciones patológicas al regular la función mitocondrial (Simpkins *et al.* 2008).

7. Justificación de los objetivos de la tesis

La autofagia es un mecanismo esencial para la homeostasis celular, especialmente en situaciones metabólicas desfavorables. Sin embargo, este proceso no ha sido estudiado en detalle en los astrocitos, a pesar la importancia de este tipo celular en la regulación metabólica. Por este motivo, decidimos caracterizar la respuesta autofágica de los astrocitos ante diversos estímulos metabólicos como el ayuno prolongado, el estradiol y el PA. En el caso del tratamiento con PA, también evaluamos otros parámetros celulares que se ven alterados por este ácido graso en los astrocitos, como son la inflamación y la pérdida de viabilidad. Además, analizamos la inducción del estrés de retículo endoplásmico, un fenómeno relacionado con la autofagia y que se encuentra alterado tras el tratamiento con PA en otros tipos celulares (Sano y Reed 2013, González-Rodríguez *et al.* 2014, Mir *et al.* 2015). Debido a que se ha descrito que el PA induce daño mitocondrial en los astrocitos, exploramos si el PA modificaba la organización y la actividad de los complejos mitocondriales, un aspecto que no ha sido descrito previamente. Además, los resultados se analizaron por separado en machos y hembras al existir importantes diferencias sexuales en la respuesta metabólica. Por último, comprobamos si un estímulo metabólico *in vivo* como el consumo agudo de HFD podía modificar la autofagia en las neuronas y las células gliales del núcleo arcuato de ratones hembra adultos.

Objetivos

1. Estudiar la respuesta de los astrocitos a estímulos metabólicos que modulan la autofagia como son el ayuno prolongado y el tratamiento con estradiol.
2. Caracterizar los efectos del PA sobre la autofagia de los astrocitos.
3. Analizar si el PA modifica otros parámetros celulares como la inflamación, el estrés de retículo endoplásmico y la viabilidad de los astrocitos.
4. Determinar si el PA modula la organización y la actividad de los complejos mitocondriales en los astrocitos.
5. Estudiar la existencia de diferencias sexuales en la respuesta de los astrocitos al ayuno prolongado, el estradiol o el PA.
6. Analizar el efecto de un consumo agudo de HFD en la autofagia de neuronas y glía del núcleo hipotalámico arcuato de ratones hembra adultos.

Materiales y métodos

1. Animales

Para la preparación de los cultivos primarios, se emplearon ratones machos y hembras de las cepas CD1 y C57BL/6J criados en el Instituto Cajal con ciclos alternos de luz y oscuridad de 12 horas, y sin restricciones de comida ni agua.

En el análisis de la autofagia *in vivo*, se utilizaron ratones hembras de la cepa C57BL/6J procedentes de Janvier Labs. Los animales llegaron al animalario del Helmholtz Zentrum München (Múnich, Alemania) con 12 semanas de edad. Allí se mantuvieron con ciclos alternos de luz y oscuridad de 12 horas, y acceso libre a la comida y el agua.

Todos los procedimientos realizados en los animales se ajustaron a la directiva de la Unión Europea (2010/63/UE) y la legislación española (R. D. 53/2013) para la protección de los animales de experimentación. Los procedimientos realizados en el Instituto Cajal fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de esta institución y la Consejería de Medio Ambiente y Territorio de la Comunidad de Madrid (PROEX 200/14). En el caso de los procedimientos practicados en el Helmholtz Zentrum München, estos se ajustaron a las directrices de dicho centro de investigación. En todos los procedimientos se tuvo especial cuidado en minimizar el sufrimiento de los animales empleados, así como en reducir su número al mínimo necesario.

2. Administración de HFD y medida de parámetros metabólicos

Tras dos semanas de aclimatación, los ratones hembra C57BL/6J se distribuyeron en 3 grupos homogéneos según su peso corporal:

1. Grupo control: los animales fueron mantenidos bajo la dieta control (LM485, Harlan Teklad) durante todo el experimento. Esta dieta presentaba una densidad energética de 3,1 kcal/g y una composición calórica del 17% de grasas, 58% de carbohidratos y 25% de proteínas.
2. Grupo HFD 5: se suministró HFD (D12231, Research Diets) 5 días antes del sacrificio. Esta dieta poseía una densidad energética de 5,56 kcal/g y una composición calórica del 58% de grasas, 25% de carbohidratos y 17% de proteínas.
3. Grupo HFD 15: se administró HFD durante un período de 15 días previo al sacrificio.

Antes de comenzar la dieta, los animales fueron mantenidos en ayunas durante 2,5 horas para medir su glucemia, su peso y su composición corporal mediante resonancia magnética nuclear (EchoMRI). En el caso del grupo control, estas medidas fueron tomadas 5 y 15 días antes del sacrificio para poder compararlas con los dos grupos alimentados con HFD (Figura 5).

La tarde previa a la finalización de la dieta, se midió el peso y la composición corporal de todos los animales. Al día siguiente, los animales se mantuvieron en ayunas durante 2,5 horas y se midió la glucemia antes del sacrificio. También se realizó un frotis vaginal para comprobar la fase del ciclo estral en la que se encontraban todas las hembras.

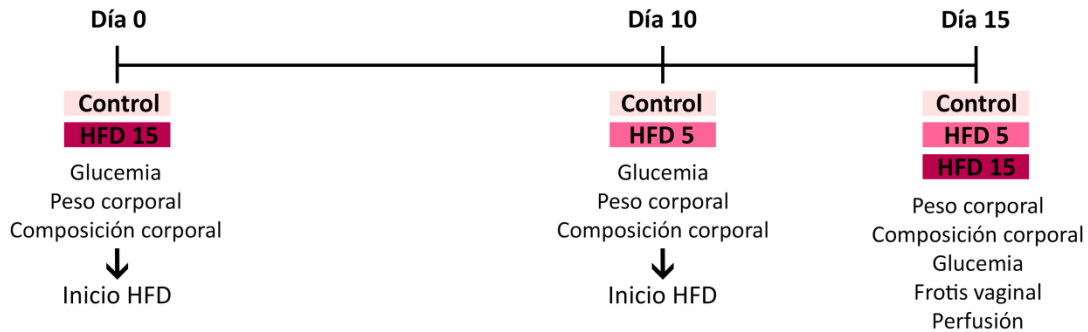


Figura 5. Diseño experimental empleado en la administración de HFD. Se estableció como día 0 el día del inicio de la dieta por parte del grupo HFD 15. En el día 10, el grupo HFD 5 comenzó a consumir la HFD. De esta forma, al alcanzar el día del sacrificio (día 15), los animales habían consumido HFD durante 15 y 5 días respectivamente. Se indican también los parámetros metabólicos y los procedimientos realizados cada día del experimento.

3. Perfusión y fijación del tejido

Los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂ y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con solución salina (NaCl al 0,9%) seguida de una solución fijadora de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,2% en tampón fosfato (PB, del inglés *phosphate buffer*) 0,1 M y pH 7,4. Una vez perfundidos, los cerebros fueron extraídos y se cortaron en 3 partes (mediante un corte rostral al quiasma óptico y un corte caudal al mesencéfalo) para facilitar el proceso de post-fijación. A continuación, los cerebros fueron sumergidos en la solución fijadora sin glutaraldehído durante 24 horas a 4°C. Una vez realizada la post-fijación, los cerebros se introdujeron en una solución de 30% sacarosa en PB 0,1 M en la que se conservaron a 4°C hasta su posterior procesamiento.

4. Procesamiento del tejido para microscopía electrónica de transmisión

Las partes de cerebro que contenían el hipotálamo fueron incluidas en agar para facilitar el corte del tejido en el Vibrátomo (Leica Biosystems). Debido a que la zona de interés para el análisis era el núcleo arcuato, se realizaron cortes de 50 µm hasta ver que el tracto óptico se lateralizaba (en torno a la coordenada Bregma -1,58 mm). En este punto, se realizaron 2-3 cortes gruesos de 200 µm que contenían la región de interés (en torno a las coordenadas Bregma -1,58 y -2,30 mm). Estas coordenadas se escogieron según el atlas de Paxinos y Franklin (Paxinos y Franklin 2004).

Una vez obtenidos los cortes, se seleccionaron aquellos que contenían la eminencia media. Los cortes seleccionados se dividieron en dos mitades a través del tercer ventrículo (mitad izquierda y derecha). De esta forma, se disminuyó la superficie del tejido para facilitar su posterior manipulación.

Los cortes se lavaron 3 veces en agua destilada para eliminar los restos de fosfato que pudiesen formar precipitados. A continuación, se fijaron con tetróxido de osmio al 1% durante 30 minutos con el objetivo de preservar y oscurecer las membranas celulares. Tras lavar los cortes con agua destilada, se incubaron durante toda la noche con acetato de uranilo al 1% para mejorar el contraste. Al día siguiente, se hicieron varios lavados en agua destilada y los cortes se deshidrataron para poder ser incluidos en la resina. La deshidratación se realizó mediante incubaciones de 5 minutos en soluciones de acetona de concentración creciente (30%, 50% 75%, 90%, 95% y 100%). En el caso de la incubación con acetona pura, este paso se repitió cuatro veces para asegurarse de que el tejido estaba completamente deshidratado.

Una vez deshidratados los cortes, se incluyeron en resina Spurr (*Low Viscosity Kit*, Ted Pella). Los cortes se embebieron en soluciones de resina/acetona con volúmenes crecientes de resina en el siguiente orden:

1. Resina/acetona 1/2 (1 hora)
2. Resina/acetona 1/1 (1 hora)
3. Resina/acetona 2/1 (1 hora)
4. Resina (1 hora)
5. Resina (toda la noche)

Por último, los cortes se polimerizaron en bloques de resina en una estufa a 60°C durante 72 horas. Una vez polimerizado, el tejido incluido en los bloques fue cortado con un ultramicrotomo. Primero se obtuvieron cortes semifinos (1 μm), que se tiñeron con azul de toluidina para ser observados en el microscopio óptico. Una vez comprobado que los cortes incluían el núcleo arcuato y que el tejido estaba en buen estado, se obtuvieron los cortes ultrafinos (50-60 nm). Dichos cortes se recogieron en rejillas de cobre cubiertas con Formvar y carbono (Ted Pella), y se tiñeron con citrato de plomo para aumentar el contraste de las muestras.

5. Análisis de autofagosomas mediante microscopía electrónica de transmisión

Las rejillas fueron visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM1010 (JEOL), perteneciente al servicio de microscopía electrónica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

(Madrid). En primer lugar, se localizó el núcleo arcuato en los cortes mediante la visualización de la eminencia media. Debido al interés en analizar la autofagia en los astrocitos, se tomaron microfotografías de los capilares sanguíneos y su periferia. Para ello se empleó la cámara CMOS TemCam F416 (TVIPS).

Para analizar la autofagia en las microfotografías, se realizó un recuento del número de autofagosomas presentes en el tejido. Los autofagosomas fueron identificados como estructuras citoplasmáticas de doble membrana y se determinó el número total de autofagosomas respecto al total del área analizada en las microfotografías de cada animal.

Junto con el recuento de los autofagosomas, se identificó el tipo celular en el que se encontraban (neurona o glía). Las neuronas fueron identificadas por la presencia del nucléolo en el núcleo, una menor condensación de la cromatina alrededor de la membrana nuclear y una mayor superficie de citoplasma en el soma que las células gliales. Los terminales presinápticos se diferenciaron del resto de componentes del neuropilo por la presencia de mitocondrias y vesículas sinápticas en ellos, así como por la observación de la densidad postsináptica en la célula adyacente. Para diferenciar las dendritas de los axones, se empleó como criterio la mayor cantidad de mitocondrias presente en las dendritas y la presencia de densidades postsinápticas en aquellas regiones en las que establecían una sinapsis. Por último, las prolongaciones gliales (mayoritariamente de los astrocitos) presentaban un citoplasma con una baja densidad electrónica y unos perfiles muy irregulares.

Mediante estos criterios se pudo determinar el tipo celular en el que se encontraban los autofagosomas. A partir de ello, se calculó el número de autofagosomas identificados en cada tipo celular y se refirió al total del área analizado en cada animal. Por último, se calculó el ratio de autofagosomas presentes en las neuronas respecto al detectado en las células gliales para determinar si existían cambios en la localización celular de los autofagosomas en función de la dieta.

6. Cultivos primarios de astrocitos

Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de ratones postnatales de entre 0 y 2 días (PNO-PN2), manteniendo por separado los machos de las hembras. El criterio empleado para distinguir el sexo de los ratones fue la presencia de una mayor distancia anogenital en los machos. Independientemente de la cepa de ratón empleada, se utilizó el mismo protocolo para la obtención de los astrocitos. Todos los resultados obtenidos a partir de cultivos de astrocitos procedieron de ratones CD1, excepto que se indique lo contrario en el texto.

Tras la extracción del cerebro, se quitaron las meninges y se aislaron las cortezas. A continuación, las cortezas fueron disgregadas mecánicamente y lavadas dos veces en HBSS (*Hank's balanced salt solution*, Sigma-Aldrich). Posteriormente, se completó la disgregación en DMEM-F12 (*Dulbecco's modified Eagle's medium* y suplemento F-12 en proporción 1:1, Sigma-Aldrich) con rojo fenol y suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen) y 1% de antibiótico/antimicótico (Invitrogen). La suspensión celular fue filtrada a través de una malla con un tamaño de poro de 40 μm para conseguir una solución de células individuales. Posteriormente, las células fueron centrifugadas, resuspendidas en el mismo medio de cultivo y sembradas en frascos de cultivo cubiertos con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich).

Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar la confluencia (aproximadamente tras 7 días en cultivo). En ese momento, los frascos de cultivo fueron agitados a 37°C y 280 r.p.m. en un agitador orbital (Infors HT) durante toda la noche. Una vez agitados, se eliminó el medio para minimizar la presencia de oligodendrocitos y microglía en el cultivo. A continuación, los cultivos se incubaron con tripsina al 0,05% (Sigma-Aldrich) para despegar las células del frasco. La suspensión celular fue centrifugada y el sedimento se resuspendió en DMEM-F12 sin rojo fenol con 10% de FBS y 1% de antibiótico. Las células se sembraron en frascos de cultivo cubiertos con poli-L-lisina y se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar de nuevo la confluencia (generalmente 5 días después). Se volvió a repetir el proceso de agitación, tripsinización y centrifugación. A continuación, las células se sembraron a una densidad de 25.000 células/cm² en placas de 6, 48 o 96 pocillos cubiertas con poli-L-lisina. Como medio de cultivo se empleó DMEM-F12 sin rojo fenol suplementado con 10% de FBS y 1% de antibiótico. Mediante este protocolo se obtuvieron cultivos de glía enriquecidos en astrocitos con un contenido menor al 5% de células positivas para Iba-1 (microglía). En la Figura 6 se muestra un resumen del protocolo utilizado para la obtención de los cultivos de astrocitos.

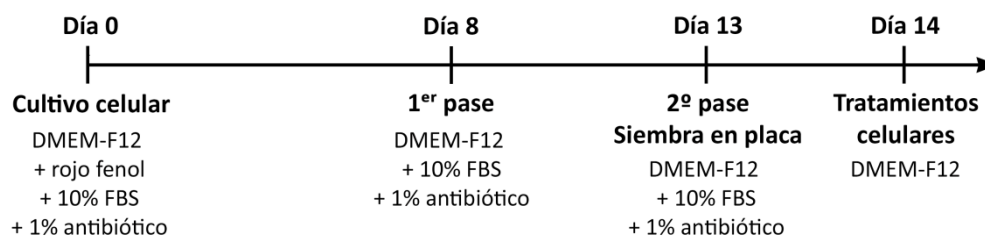


Figura 6. Resumen temporal del protocolo empleado para la obtención de cultivos primarios de astrocitos. Se indica el día aproximado de realización de cada pase así como el tipo de medio de cultivo empleado en cada uno de los pasos.

7. Tratamientos celulares

Todos los tratamientos se realizaron tras haber transcurrido 24 horas desde la siembra de los astrocitos en placa. Las células se lavaron en tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) y se añadieron los tratamientos, empleando DMEM-F12 sin rojo fenol ni aditivos como medio de cultivo (Tabla 2).

7.1. Tratamiento con ácido palmítico (PA)

El PA (Sigma-Aldrich) se disolvió en metanol a 75°C y con agitación, para obtener una concentración de 0,5 M. Una vez disuelto, se diluyó a 50°C en una solución salina que contenía 5% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) libre de ácidos grasos y endotoxina. Se obtuvo una solución de PA con una concentración final de 5 mM, que se mantuvo a 50°C durante 30 minutos más. Posteriormente, se agitó a 37°C durante toda la noche y se filtró a través de un poro de 22 µm para eliminar precipitados. Finalmente, se alicuotó y guardó a -20°C para su posterior utilización. La solución empleada como vehículo se preparó usando el mismo protocolo pero sin añadir PA.

Las dosis de PA empleadas para tratar los astrocitos fueron 250 µM y 500 µM. Estas dosis están dentro del rango de los niveles encontrados en el plasma de ratones bajo condiciones fisiológicas y tras la administración de HFD (Yamato *et al.* 2007, Alshali *et al.* 2016). Los astrocitos del grupo control fueron tratados con la solución vehículo. La duración del tratamiento con vehículo o PA fue de 4,5 o 24 horas, dependiendo del experimento.

7.2. Tratamiento con agonistas de los receptores de estrógeno (ER)

Para estudiar el posible papel protector de los estrógenos ante los efectos del PA y su participación en la regulación de la autofagia, se utilizaron diferentes agonistas de los ER: 17β-estradiol (E2); el agonista específico del ERα, 4,4',4''-(4-Propil-[1H]-pirazol-1,3,5-triyl)trisfenol (PPT); el agonista específico del ERβ, 2,3-bis(4-Hidroxifenil)-propionitrilo (DPN); y el agonista específico del receptor GPER, 1-[(3aR*,4S*,9bS*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinolin-8-yl]-etanona (G1).

En los experimentos realizados para determinar el efecto protector ante el PA, los astrocitos fueron pretratados con estos agonistas durante 24 horas. A continuación, se trataron con PA o vehículo en combinación con los agonistas durante 24 horas más.

En el estudio de la regulación de la autofagia por estradiol, los astrocitos fueron tratados con dichos agonistas durante 4 horas.

7.3. Tratamiento con inhibidores

Se emplearon los siguientes inhibidores: inhibidor de la enzima aromatasa, 4,4'-(1*H*-1,2,4-Triazol-1-ilmetileno)*bis*benzotrilo o letrozol (Let); el inhibidor lisosomal, HCQ; el inhibidor de mTOR, rapamicina (Rap); y el inhibidor de la síntesis de peptidoglicanos e inductor de estrés de retículo endoplásmico, tunicamicina (Tun).

El tratamiento con letrozol siguió el mismo patrón que el empleado con los agonistas de ER. Los astrocitos fueron pretratados con letrozol durante 24 horas y posteriormente, tratados con PA o vehículo más letrozol durante 24 horas adicionales.

En el caso de la HCQ, este compuesto se añadió en las últimas 4,5 horas del tratamiento con vehículo o PA para determinar el flujo de autofagia. También se midió la viabilidad celular tras el tratamiento con HCQ durante 4,5 y 24 horas en ausencia y presencia de PA. Por último, se empleó en combinación con los agonistas de ER (4 horas) para determinar si el flujo de autofagia se veía afectado por dichos agonistas.

Respecto a la rapamicina, los astrocitos fueron pretratados durante 2 horas y después tratados con PA o vehículo en presencia de este inhibidor durante 24 horas. Por último, los astrocitos fueron tratados con tunicamicina durante 6 horas como control positivo de la inducción de estrés de retículo endoplásmico.

Compuesto	Función	Concentración	Tiempo	Casa comercial
PA	Ácido graso saturado	250 y 500 μ M	4,5 h y 24 h	Sigma-Aldrich
E2	Agonista ERs	0,1 nM	24 h + 24 h ^a 4 h ^b	Sigma-Aldrich
PPT	Agonista ER α	10 nM	24 h + 24 h ^a 4 h ^b	Tocris Bioscience
DPN	Agonista ER β	10 nM	24 h + 24 h ^a 4 h ^b	Tocris Bioscience
G1	Agonista GPER	100 nM	24 h + 24 h ^a 4 h ^b	Tocris Bioscience
Let	Inhibidor aromatasa	100 nM	24 h + 24 h	Sigma-Aldrich
HCQ	Inhibidor lisosomal	30 μ g/ml	4,5 h y 24 h ^a 4 h ^b	Laboratorios Rubió
Rap	Inhibidor mTOR	0,2 μ g/mL	2 h + 24 h ^a	Sigma-Aldrich
Tun	Inductor estrés de retículo endoplásmico	1 μ g/mL	6 h	Sigma-Aldrich

Tabla 2. Resumen de los tratamientos aplicados a los cultivos de astrocitos. Se especifica la función, concentración, duración y casa comercial de cada uno de los compuestos empleados. ^a caracterización del efecto del PA en astrocitos. ^b estudio del efecto del estradiol en la autofagia de los astrocitos.

7.4. Ayuno

Para estudiar el efecto del ayuno en la autofagia de los astrocitos, se empleó como medio de cultivo DMEM-F12 sin rojo fenol ni aditivos durante 4, 8 y 24 horas.

8. Western blot

Una vez realizados los tratamientos, las células fueron lisadas en 200 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; ditioneitol 100 mM; inhibidores de proteasas y fosfatasa; y azul de bromofenol). Las muestras fueron hervidas y sonicadas durante 5 minutos. Una vez solubilizadas, las proteínas (20 μ l) se resolvieron en geles de acrilamida/bis-acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE 6, 12 y 15%) a 100 V y temperatura ambiente.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF de 0,2 μ m de poro (*Trans-Blot Turbo Transfer Pack*, Bio-Rad) mediante un sistema de transferencia semiseco (*Trans-Blot Turbo Transfer System*, Bio-Rad). Las condiciones de transferencia empleadas fueron 1,3 A durante 14 minutos. En el caso de la transferencia para la detección posterior de mTOR, se empleó el sistema de transferencia húmedo con las siguientes condiciones: 330 mA durante 120 minutos a 4°C en tampón de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM; 20% metanol; 0,12% SDS; pH 8,3).

Las membranas se bloquearon con BSA al 5% (p/v) en TTBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 y 0,1% (p/v) de Tween-20) durante 90 min. Una vez bloqueadas, se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo (Tabla 3). Tras varios lavados en TTBS, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario generado en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, Jackson ImmunoResearch) o con un marcador infrarrojo (LI-COR Bioscience). Ambos tipos de anticuerpos secundarios se utilizaron diluidos 1:10.000 en TTBS y las membranas se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente. El revelado de las membranas se realizó con un reactivo de quimioluminiscencia mejorado (ECL, GE Healthcare) o a través del sistema de detección infrarroja Odyssey CLx (LI-COR Bioscience). Los análisis densitométricos se realizaron con el software ImageJ o con Image Studio Lite. Los niveles de proteína de cada muestra fueron normalizados al control de carga (promedio de los niveles de β -actina y α -tubulina) y se representaron como porcentaje del grupo control.

Antígeno	Especie hospedadora	Dilución	Referencia	Casa comercial	Peso molecular (kDa)
LC3B	Conejo	1:3.500	L7543	Sigma-Aldrich	12 (LC3-II) 17 (LC3-I)
p62	Conejo	1:1.000	5114	Cell Signaling	62
p-mTOR (Ser2448)	Conejo	1:1.000	2971	Cell Signaling	289
mTOR	Conejo	1:1.000	2983	Cell Signaling	289
CHOP	Ratón	1:1.000	2895	Cell Signaling	27
β -Actina	Ratón	1:4.000	A5316	Sigma-Aldrich	42
α -Tubulina	Ratón	1:5.000	T5168	Sigma-Aldrich	50

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de proteínas separadas mediante SDS-PAGE. Se indica la especie en la que se produjo, la dilución empleada, la referencia y la casa comercial de cada uno de los anticuerpos primarios empleados, así como el peso molecular de la proteína analizada.

9. Aislamiento y solubilización de mitocondrias

La obtención de las mitocondrias y el análisis de la organización mitocondrial se realizó en el laboratorio de *Neuroenergetics and Metabolism Group* (Instituto de Biología Funcional y Genómica, Salamanca).

Para aislar y solubilizar las mitocondrias, se empleó el protocolo descrito por Acín-Pérez *et al.* (2008). Las mitocondrias se obtuvieron a partir de 30-40 millones de astrocitos en cultivo para cada grupo experimental. Las células fueron homogeneizadas con un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio-teflón en tampón A (sacarosa 83 mM; MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 10 mM; pH 7,2) mediante 10 pulsos con el homogeneizador. A continuación, se añadió el mismo volumen de tampón B (sacarosa 250 mM; MOPS 30 mM; pH 7,2) a cada muestra. Las muestras se centrifugaron a 1.000 g durante 5 minutos para eliminar los núcleos y las células que no estuviesen rotas. El sobrenadante resultante se centrifugó a 12.000 g durante 2 minutos para obtener la fracción mitocondrial. Esta fracción se lavó en Tampón C (sacarosa 320 mM; EDTA 1mM; Tris-HCl 10 mM; pH 7,4) usando las mismas condiciones de centrifugación. Por último, las mitocondrias se resuspendieron en Tampón D (ácido 6-aminohexanoico 1M; Bis-Tris-HCl 50 mM; pH 7).

Una vez obtenidas, las mitocondrias se solubilizaron con digitonina (4 g/g) durante 5 minutos en hielo. Por último, fueron centrifugadas a 13.000 g durante 30 minutos y se recogió el sobrenadante, que contenía las mitocondrias solubilizadas.

10. BN-PAGE

Para analizar la organización de los complejos mitocondriales, se empleó la técnica de BN-PAGE. Las proteínas mitocondriales solubilizadas (10-50 µg por muestra) se cargaron en geles nativos del 3-12% (NativePAGE Novex, Life Technologies) usando un tampón de carga que contenía el colorante Serva Blue G y ácido 6-aminohexanoico. Tras la separación electroforética, se realizaron ensayos de actividad de los complejos mitocondriales en los propios geles o se llevó a cabo una transferencia de las proteínas para su posterior inmunodetección. Antes de realizar la transferencia, los geles fueron agitados durante 20 minutos a 4°C en tampón carbonatado (NaHCO₃ 10 mM; Na₂CO₃·10H₂O 3mM; pH 9,5-10). A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa usando 300 mA durante 1,5 horas a 4°C en tampón carbonatado.

Para realizar la inmunodetección, se emplearon anticuerpos primarios frente a diversas subunidades de los complejos mitocondriales (Tabla 4). Los anticuerpos secundarios empleados estaban conjugados con HRP (Santa Cruz) y habían sido generados en cabra o conejo. Como control de carga se empleó la proteína de choque térmico de 60 kDa (Hsp60, del inglés *heat shock protein 60*). Los niveles de esta proteína mitocondrial no se modificaron significativamente ni en función del sexo ni del tratamiento de las muestras.

Antígeno	Complejo mitocondrial	Especie hospedadora	Dilución	Referencia	Casa comercial
NDUFS1	I	Cabra	1:500	sc-50132	Santa Cruz
SDHA	II	Ratón	1:1.000	ab14715	Abcam
UQCRC2	III	Ratón	1:1.000	ab14745	Abcam
MTCO1	IV	Ratón	1:1.000	ab14705	Abcam
ATPB	V	Ratón	1:1.000	MS503	MitoSciences
Hsp60	-	Conejo	1:1.000	ab46798	Abcam

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados para la inmunodetección de las proteínas mitocondriales separadas mediante BN-PAGE. Se indica el complejo mitocondrial al que pertenece cada una de las proteínas analizadas. Además, se especifica la especie en la que se produjo, la dilución empleada, la referencia y la casa comercial de cada uno de los anticuerpos primarios usados.

11. Ensayos de actividad en gel de los complejos mitocondriales

Tras separar las proteínas mitocondriales mediante BN-PAGE, la actividad del complejo I se midió directamente en el propio gel. Para ello, los geles fueron incubados en una solución que contenía Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4), nitroazul de tetrazolio 1mg/ml y NADH 0,14 mM durante 30-40 minutos a temperatura ambiente. Se observó la presencia de precipitados morados que indican la actividad NADH oxidasa.

Para medir la actividad de la ATP sintasa, los geles fueron incubados a 37°C durante 3 horas en una solución que contenía Tris 35 mM, glicina 270 mM, MgSO₄ 14 mM, 0,2 % Pb(NO₃)₂ y ATP 5 mM (pH 8,6). La aparición de bandas plateadas indica la presencia de actividad ATPasa en las muestras.

12. Ensayos de viabilidad celular

Para evaluar el efecto tóxico del PA así como la posible protección por otros compuestos, las células se sembraron en placas de 96 pocillos. Una vez finalizados los tratamientos, el medio de cultivo fue aspirado y las células se incubaron con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich). El MTT es un compuesto soluble de color amarillo que al reducirse por la actividad metabólica de las células se transforma en un compuesto de color violeta insoluble en agua. Para cuantificarlo, se disuelve en un disolvente orgánico como el dimetilsulfóxido (DMSO) y se mide su absorbancia. El MTT se disolvió en DMEM-F12 sin rojo fenol ni aditivos a una concentración de 0,5 mg/ml. Después de 3 horas de incubación a 37°C y 5% CO₂, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 µl de DMSO (Sigma-Aldrich) a cada pocillo. La absorbancia se midió a 595 nm de longitud de onda en un lector de placas Multiskan (Thermo Fisher).

Para confirmar los cambios observados en la viabilidad celular, se llevó a cabo el ensayo de diacetato de fluoresceína (FDA, Sigma-Aldrich). El FDA atraviesa la membrana celular y es hidrolizado por las esterasas intracelulares, produciendo fluoresceína (un compuesto polar fluorescente que permanece en el interior de las células vivas). Para llevar a cabo esta técnica, los astrocitos se sembraron en placas de 48 pocillos. Tras realizar los diferentes tratamientos experimentales, los astrocitos fueron incubados con FDA (100 µM en DMEM-F12 sin rojo fenol ni aditivos) durante 50 minutos a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con medio de cultivo y la emisión de fluorescencia (proporcional al número de células vivas) se midió en un lector de placas FLUOstar (BMG LABTECH).

13. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

Tras realizar los distintos tratamientos, se extrajo el ARN mensajero (ARNm) mediante el kit *Illustra RNAspin Mini* (GE Healthcare). Después, se sintetizó el ADN copia (ADNc) a partir de 2 µg de ARNm usando la enzima transcriptasa inversa (M-MLV, Promega) según las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ADNc se amplificó mediante PCR en tiempo real con *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems), usando los parámetros recomendados por el fabricante (40 ciclos consistentes en 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C). La enzima polimerasa utilizada fue la presente en *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) y los cebadores

empleados fueron diseñados usando el programa Primer Express 3.0 de Applied Biosystems (Tabla 5). Para cada par de cebadores se seleccionó la dilución de ADNc apropiada para conseguir la misma eficiencia de amplificación que la de los genes de control endógeno (ARNr 18S, β -actina y Rpl13a). Los cambios en la expresión de ARNm se calcularon según el método $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl 2001). Además, se empleó el parámetro *Best Keeper Index* para determinar la estabilidad de los genes de control endógeno y estimar la cantidad de ARNm en cada muestra (Pfaffl *et al.* 2004).

Gen	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
ARNr 18S	CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG
β -Actina	CAACTTGATGTATGAAGGCTTTGGT	ACTTTTATTGGTCTCAAGTCAGTGACAG
Rpl13A	TACCAGAAAGTTTGCTTACCTGGG	TGCCTGTTTCCGTAACCTCAAG
Map1lc3b	GGATGTGGTTGTCAAGTGGTAGAC	CTGTCAGAACCACCCTTACAGAGA
Sqstm1	CCTCAGCCCTCTAGGCATTG	TGTGCCTGTGCTGGAACCTTC
TNF- α	GAAAAGCAAGCAGCCAACCA	CGGATCATGCTTTCTGTGCTC
IL-1 β	CGACAAAATACCTGTGGCCT	TTCTTTGGGTATTGCTTGGG
IL-6	GAAACCGCTATGAAGTTCCTCTCTG	TGTTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA
ER α	GATCCCACCATGCACAGTGA	GGAGCATCTACAGGAACACAGGTA
ER β	CCTGGTCTGGGTGATTCGA	ACTGATGTGCCTGACATGAGAAAG
GPER	TGCTGCCATCCAGATTCAAG	GGGAACGTAGGCTATGGAAAGAA

Tabla 5. Cebadores empleados en el análisis del ARNm mediante RT-qPCR. Se indica la secuencia de cada uno de los cebadores diseñados, validados y empleados para analizar los niveles de ARNm de los genes de interés.

14. Inmunocitoquímica

Para los estudios de inmunocitoquímica, los astrocitos fueron sembrados en cubreobjetos. Tras realizar los tratamientos correspondientes, las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces con PB 0,1 M (pH 7,4) y 2 veces más con PB/gelatina al 0,12%. La gelatina se empleó como agente bloqueante para reducir el marcaje inespecífico. Posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,12% en PB/gelatina durante 4 minutos y se realizaron 3 lavados en PB/gelatina. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en PB/gelatina durante 90 minutos a temperatura ambiente (Tabla 6). Tras varios lavados en PB/gelatina, los cubreobjetos se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los cubreobjetos fueron lavados varias veces con PB/gelatina y PB, y se secaron. A continuación, se montaron en Vectashield-DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Vector Laboratories) y se sellaron con laca de uñas. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo x63 en un microscopio confocal Leica SP-5.

Antígeno	Especie hospedadora	Dilución	Referencia	Casa comercial
GFAP	Ratón	1:500	G3893	Sigma-Aldrich
p62	Cobaya	1:150	GP62-C	Progen
Anti-ratón Alexa 488	Cabra	1:500	115-545-166	Jackson ImmunoResearch
Anti-cobaya Cy3	Cabra	1:250	106-165-003	Jackson ImmunoResearch

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la inmunocitoquímica. Se indica la especie en la que se produjo, la dilución, la referencia y la casa comercial de los anticuerpos utilizados en la inmunocitoquímica.

15. Análisis estadístico

Los datos mostrados en las gráficas están expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM). El tamaño muestral se corresponde con el número de animales usados para los cultivos de manera independiente y aparece indicado en el pie de cada figura. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 23 (IBM). La normalidad y la homocedasticidad de los datos se comprobaron con las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente. En aquellos casos en los que las variables no seguían una distribución normal, fueron transformadas mediante logaritmo o rangos para obtener dicha distribución. Si tras realizar estas transformaciones tampoco se cumplía el requisito de normalidad en todos los grupos experimentales, se empleó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Para determinar la presencia de diferencias significativas entre más de dos grupos experimentales cuyos datos eran normales, se realizaron pruebas de análisis de la varianza (ANOVA) seguidas de la correspondiente prueba *post hoc* (Bonferroni o Games-Howell en función de si existía homocedasticidad o heterocedasticidad, respectivamente). En función del número de variables estudiadas, se realizaron pruebas ANOVA de una y dos vías. Cuando no existía interacción entre las dos variables, se analizó cada factor de manera independiente. Las comparaciones entre las medias de dos grupos experimentales se realizaron mediante la prueba t de Student. En el caso de que los datos no fuesen normales, la comparación entre los dos grupos se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. El nivel de significación estadística en todos los casos se estableció en valores de p menores a 0,05.

Resultados

1. Modulación de la autofagia mediante el ayuno prolongado en astrocitos

En primer lugar, se comprobó si los astrocitos regulaban su autofagia en respuesta al ayuno prolongado. Debido a que el ayuno activa la autofagia en diversos órganos y tipos celulares como las neuronas (Mizushima *et al.* 2004, Alirezai *et al.* 2010), los cultivos de astrocitos fueron ayunados durante 4, 8 y 24 horas mediante el uso de DMEM-F12 sin suplementar.

Tras el ayuno se midieron los niveles de LC3-II, un buen indicador de la formación de autofagosomas debido a la correlación que existe entre sus niveles y el número de autofagosomas presentes en la célula (Kabeya *et al.* 2000). En los cultivos de astrocitos de las hembras se observó que el incremento en el tiempo de ayuno tendió a disminuir los niveles de LC3-II ($p=0,084$), siendo significativa su reducción tras 24 horas de ayuno (Figuras 7A-7B).

Una disminución de los niveles de LC3-II se correlaciona con un menor número de autofagosomas en los astrocitos. Debido a que el proceso de autofagia es muy dinámico, la reducción del número de autofagosomas puede corresponderse tanto con una menor formación como con una mayor degradación de los mismos. Por este motivo, analizar únicamente los niveles de LC3-II no es un método suficiente para determinar la actividad autofágica de las células (Klionsky *et al.* 2016).

A continuación, se midieron los niveles de p62, proteína cuya degradación depende del mecanismo de autofagia (Komatsu *et al.* 2007). El tiempo de ayuno sólo tuvo efecto significativo en los astrocitos de las hembras, en los que los niveles de p62 eran menores tras 24 horas de ayuno que tras 4 y 8 horas de ayuno (Figura 7C-7D). Estos resultados fueron confirmados mediante inmunocitoquímica, técnica que permitió visualizar la reducción de p62 en los astrocitos de machos y hembras tras 24 horas de ayuno (Figura 8).

La disminución conjunta de los niveles de LC3-II y p62 podría ser el resultado de la activación de la autofagia en los cultivos de astrocitos. Para confirmarlo se midió el flujo de autofagia utilizando HCQ, un inhibidor de la función lisosomal que impide la fusión de los autofagosomas con los lisosomas (Esteban-Martínez y Boya 2015). Los astrocitos fueron tratados con HCQ durante las 4 últimas horas del período de ayuno y se midieron los niveles de LC3-II por Western blot. El flujo de autofagia se calculó como el ratio de los niveles de LC3-II detectados en presencia de HCQ respecto a los niveles de LC3-II en ausencia de HCQ para cada tiempo de ayuno. El tiempo de ayuno tuvo un efecto significativo en el flujo de LC3-II tanto en los machos como en las hembras. Concretamente, el ayuno durante 24 horas incrementó de manera significativa el flujo de LC3-II en los astrocitos de ambos sexos (Figuras 7E-7F).

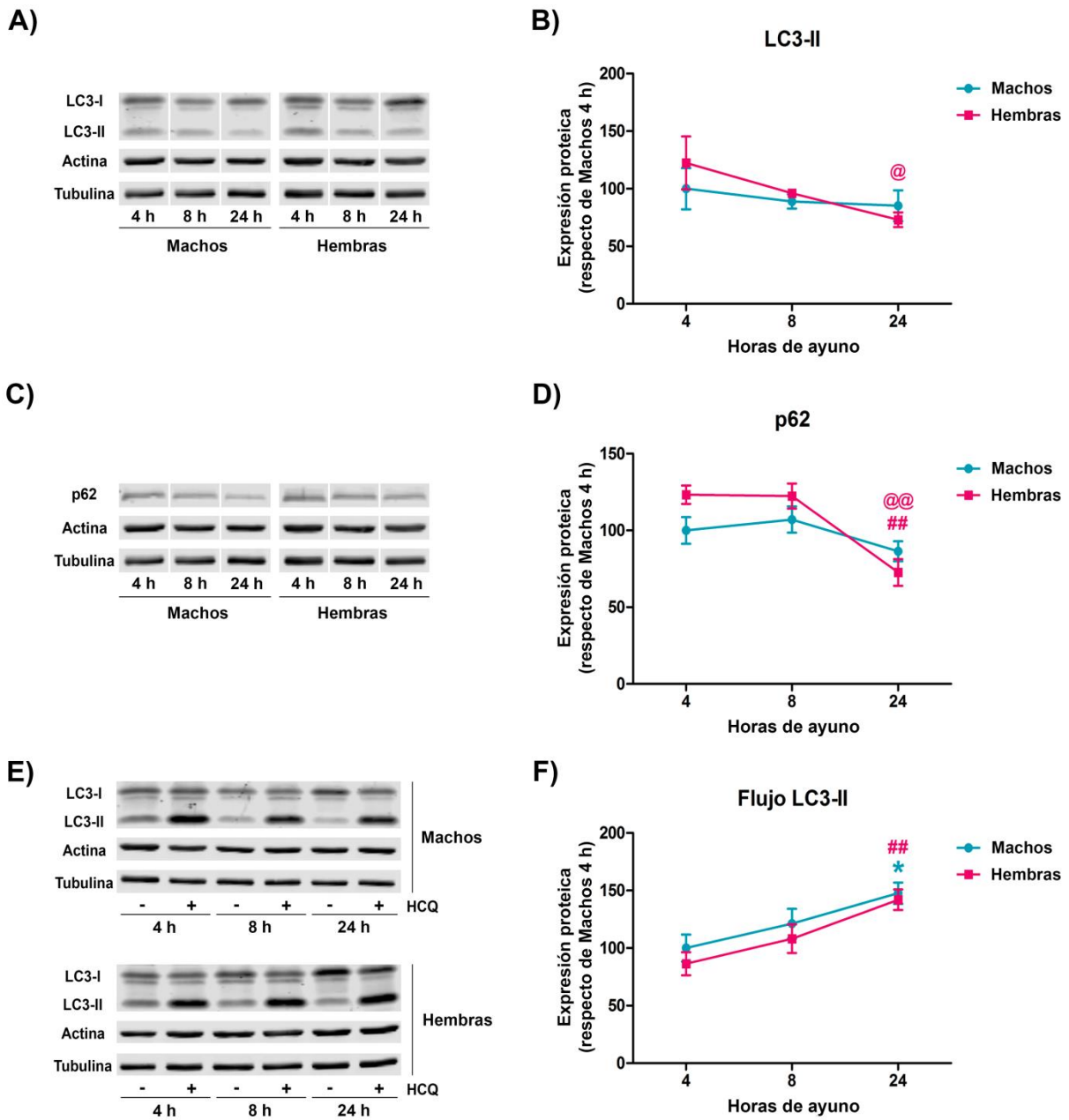


Figura 7. El ayuno prolongado activa la autofagia en los cultivos de astrocitos. Los cultivos de astrocitos fueron ayunados durante 4, 8 y 24 horas usando DMEM-F12 sin suero ni antibiótico. A) Imagen representativa de la detección de LC3-II por Western blot. B) Niveles de proteína LC3-II. C) Imagen representativa de la detección de p62 por Western blot. D) Niveles de proteína p62. E) Imagen representativa de la detección de LC3-II para calcular el flujo de LC3-II. F) Flujo de LC3-II medido como el ratio de los niveles de LC3-II en las muestras con HCQ respecto a las muestras sin HCQ ayunadas durante el mismo período de tiempo. N=5-7. Diferencias significativas: * $p < 0,05$ respecto de machos 4 h; ## $p < 0,01$ respecto de hembras 4 h; @ $p < 0,05$; @@ $p < 0,01$ respecto de hembras 8 h.

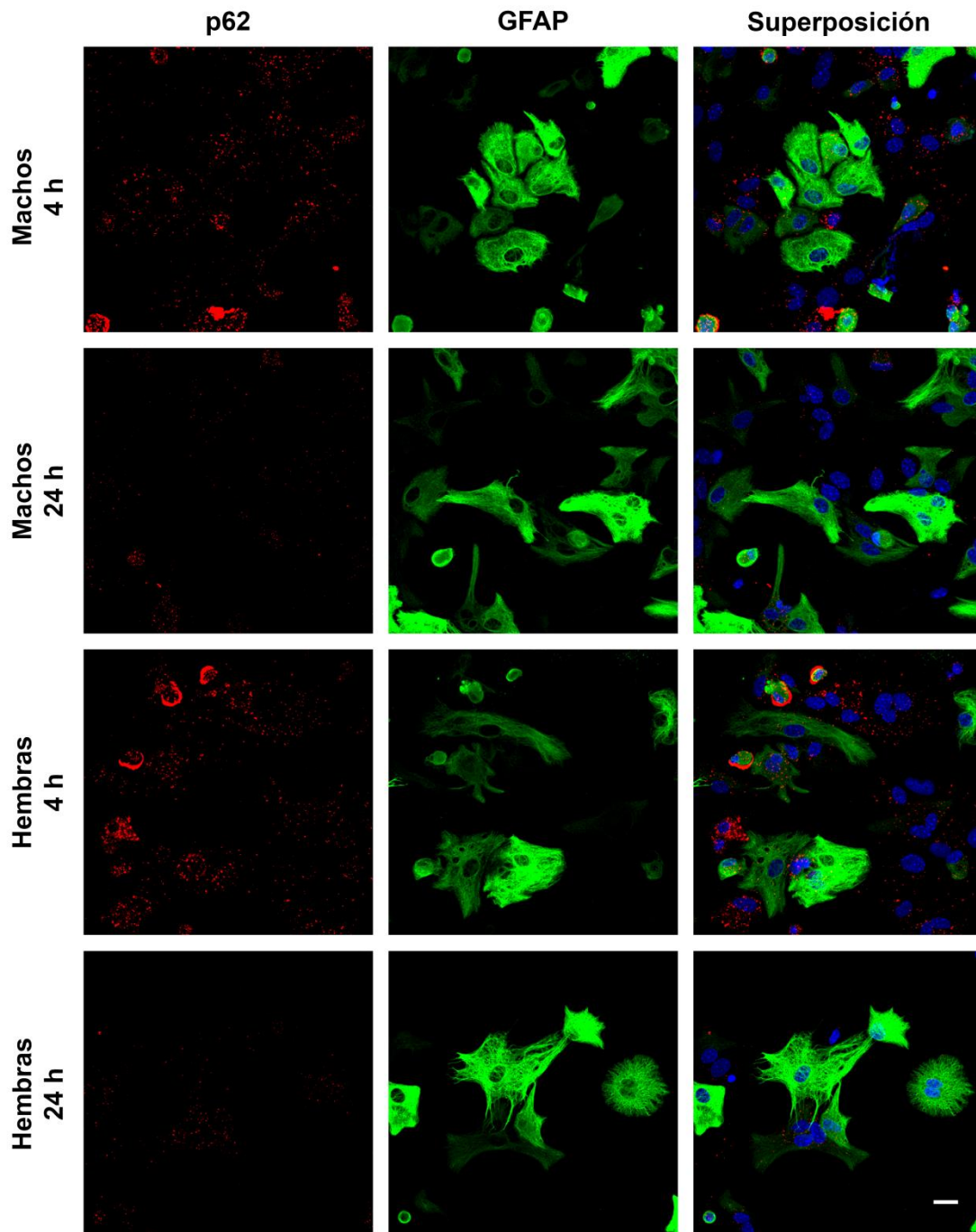


Figura 8. El ayuno prolongado disminuye los niveles de p62 en los astrocitos. Los cultivos de astrocitos fueron ayunados durante 4 y 24 horas mediante la incubación con DMEM-F12 sin suero ni antibiótico, tras lo que fueron fijados. Mediante inmunocitoquímica se detectaron las proteínas p62 (rojo), marcador de autofagia, y GFAP (verde), marcador de astrocitos. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas de cada uno de los grupos experimentales en las que se observa la disminución del marcaje de p62 tras 24 horas de ayuno respecto a 4 horas de ayuno. Este efecto se detecta tanto en los cultivos de machos como de hembras. N=3. Barra de escala: 20 μ m.

A partir de estos resultados se puede concluir que la autofagia es un proceso que se encuentra activo en los cultivos primarios de astrocitos y que puede ser activado por un ayuno prolongado.

2. Regulación de la autofagia tras el tratamiento con estradiol en astrocitos

Diversos estudios han demostrado que el estradiol puede modular la autofagia en tipos celulares como los osteoblastos o los cardiomiocitos (Yang *et al.* 2013, Wang *et al.* 2014). Tras comprobar que los astrocitos en cultivo eran capaces de regular su autofagia en respuesta al ayuno prolongado, se analizó la posible modulación de la autofagia por estradiol. Para ello, los cultivos de astrocitos fueron tratados con estradiol durante 4 horas y se analizaron los niveles de proteína de LC3-II y p62 por Western blot.

El tratamiento con estradiol aumentó los niveles de LC3-II en los astrocitos de machos y hembras (Figuras 9A, 9D). Además, incrementó los niveles de p62 en ambos sexos (Figuras 9B, 9E). La presencia de un mayor número de autofagosomas, indicado por el aumento de LC3-II, podría deberse a una mayor formación de los mismos. Sin embargo, el incremento de p62 sugiere una disminución de su degradación debido a una menor activación de la autofagia.

Para confirmar el efecto del estradiol en la autofagia, los astrocitos fueron tratados con estradiol y HCQ, y se analizaron los niveles de LC3-II por Western blot. A partir de ello, se determinó el flujo de LC3-II en cada grupo experimental. El estradiol disminuyó de manera significativa el flujo de LC3-II en los astrocitos de los machos, mientras que el descenso del flujo en las hembras no fue significativo (Figuras 9C, 9F). Estos resultados sugieren que el tratamiento con estradiol bloquea el flujo de autofagia en los astrocitos.

Una vez comprobado que el estradiol regulaba la autofagia en los astrocitos, se estudió la contribución específica de cada ER en esta respuesta. Para ello, los astrocitos fueron tratados con los agonistas específicos del ER α (PPT), ER β (DPN) y GPER (G1) durante 4 horas. A continuación, se analizaron los parámetros autofágicos anteriores.

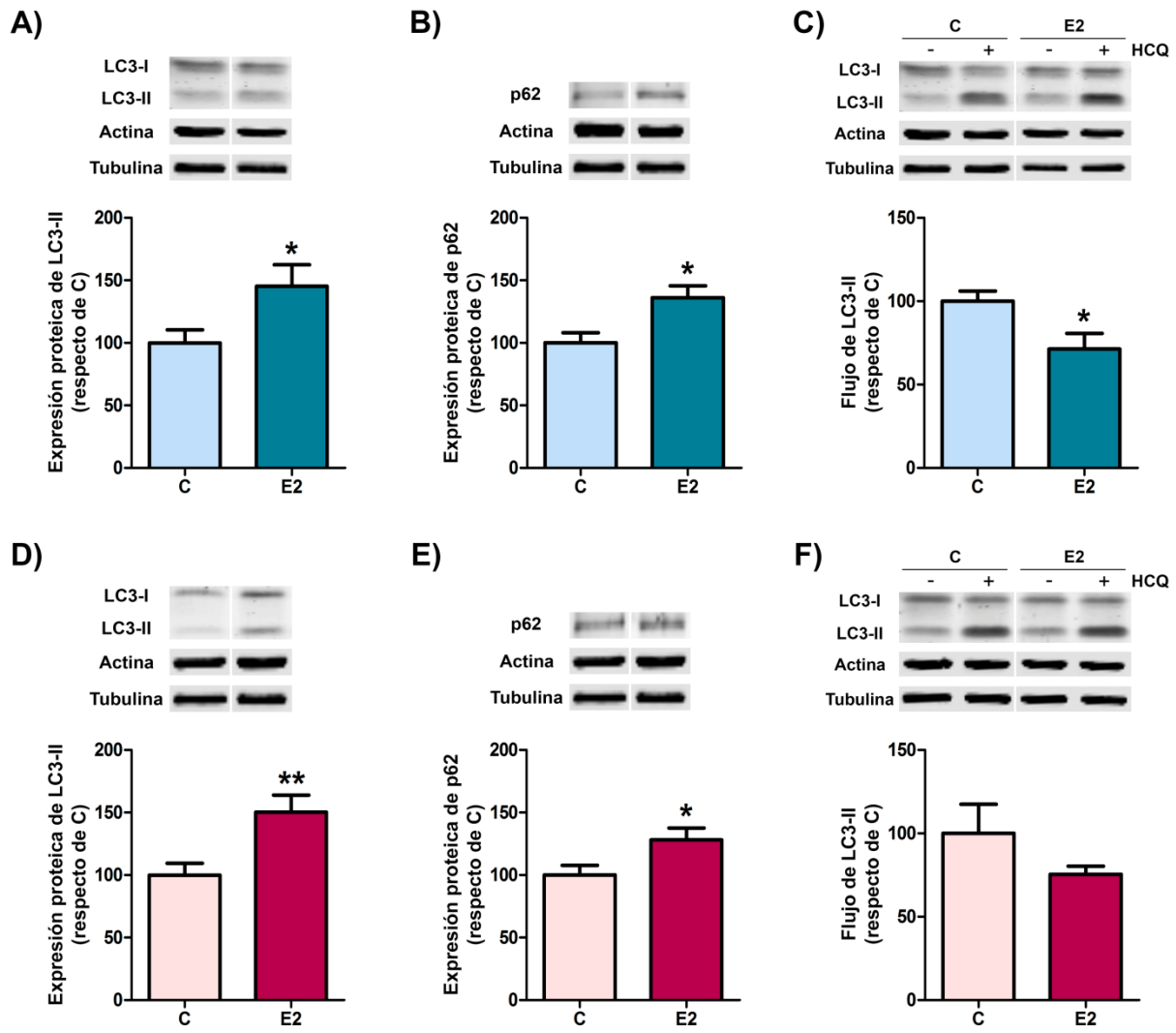


Figura 9. El tratamiento con estradiol bloquea la autofagia en los astrocitos de machos y hembras. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con estradiol (E2) durante 4 horas. A) Niveles de proteína LC3-II en los astrocitos de machos. B) Niveles de proteína p62 en los astrocitos de machos. C) Flujo de LC3-II en los astrocitos de machos, cuantificado como el ratio de los niveles de LC3-II en las muestras con HCQ respecto a las muestras sin HCQ del mismo grupo experimental. D) Niveles de proteína LC3-II en los astrocitos de hembras. E) Niveles de proteína p62 en los astrocitos de hembras. F) Flujo de LC3-II en los astrocitos de hembras. N=6-7. Diferencias significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto del grupo control.

El tratamiento con PPT no modificó ninguno de los parámetros de autofagia en los astrocitos de los machos (Figuras 10A-10C). En el caso de los astrocitos de las hembras, el PPT tendió a aumentar los niveles de LC3-II ($p=0,058$) e incrementó los niveles de p62, simulando el efecto del estradiol (Figuras 10D-10F).

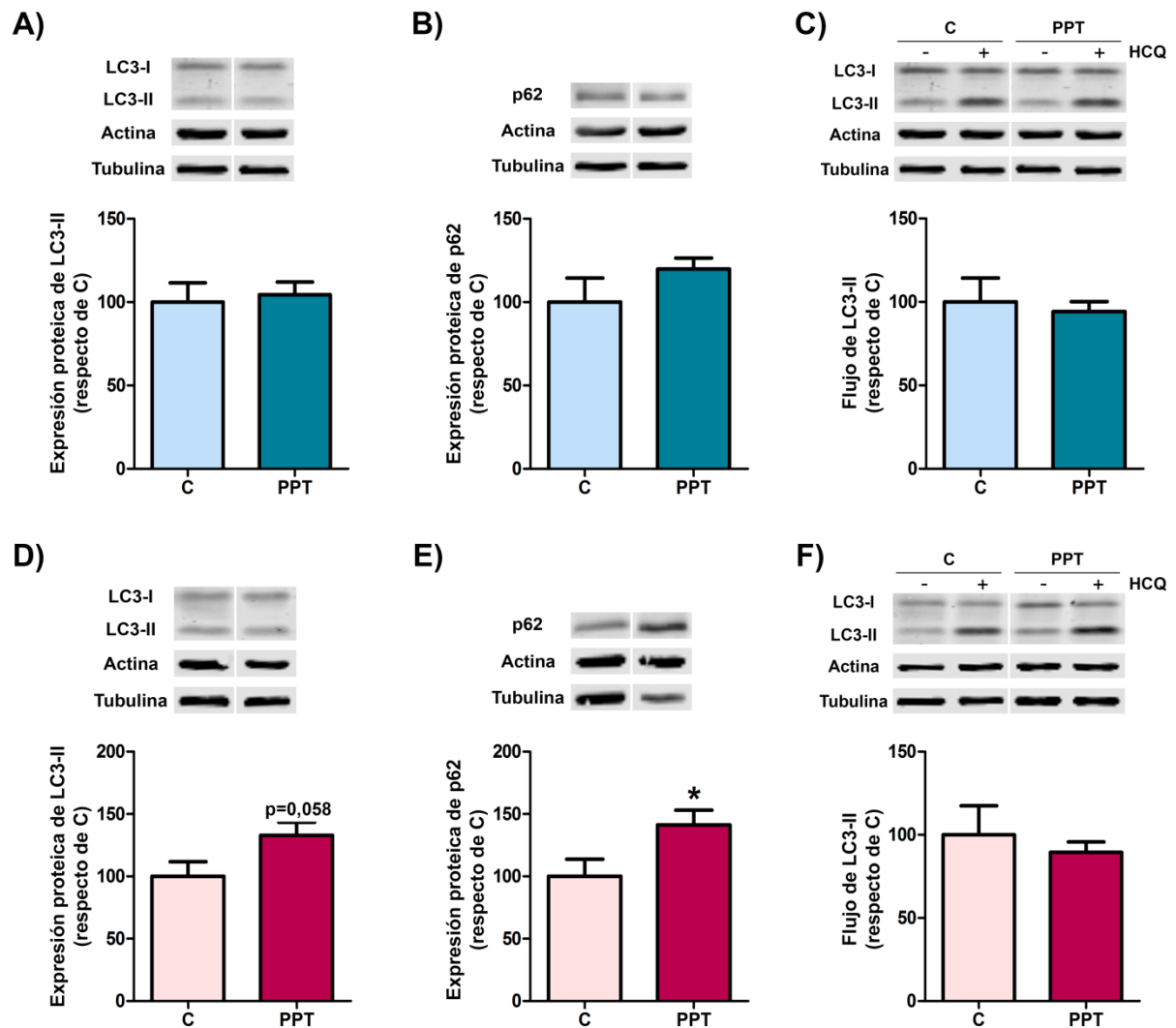


Figura 10. El tratamiento con PPT tiende a bloquear la autofagia en los astrocitos de las hembras. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con PPT (agonista del ER α) durante 4 horas. A) Niveles de proteína LC3-II en los astrocitos de machos. B) Niveles de proteína p62 en los astrocitos de machos. C) Flujo de LC3-II en los astrocitos de machos, calculado como el ratio de los niveles de LC3-II en las muestras con HCQ respecto a las muestras sin HCQ del mismo grupo experimental. D) Niveles de proteína LC3-II en los astrocitos de hembras. E) Niveles de proteína p62 en los astrocitos de hembras. F) Flujo de LC3-II en los astrocitos de hembras. N=7. Diferencias significativas: * $p<0,05$ respecto del grupo control.

Respecto al tratamiento con DPN, este no reguló los parámetros de autofagia en los astrocitos de los machos (Figuras 11A-11C). En los astrocitos de las hembras, aunque el DPN no modificó los niveles de LC3-II, aumentó los niveles de p62 y tendió a disminuir el flujo de LC3-II ($p=0,068$) (Figuras 11D-11F).

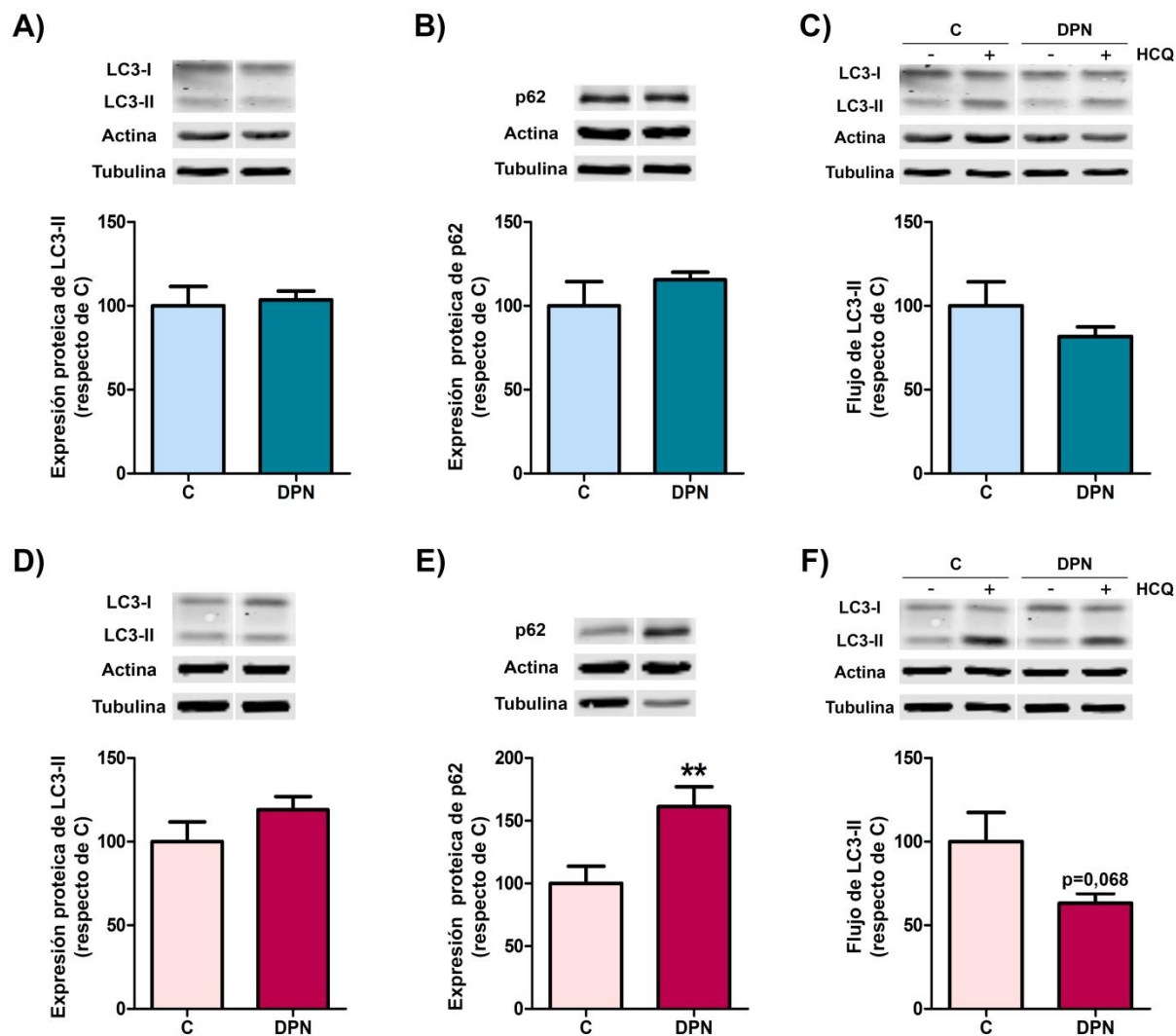


Figura 11. El tratamiento con DPN modula la autofagia en los astrocitos de las hembras. Los astrocitos en cultivo fueron tratados con DPN (agonista del ER β) durante 4 horas. A) Niveles de proteína LC3-II en los astrocitos de machos. B) Niveles de proteína p62 en los astrocitos de machos. C) Flujo de LC3-II en los astrocitos de machos, cuantificado como el ratio de los niveles de LC3-II en las muestras con HCQ respecto a las muestras sin HCQ del mismo grupo experimental. D) Niveles de proteína LC3-II en los astrocitos de hembras. E) Niveles de proteína p62 en los astrocitos de hembras. F) Flujo de LC3-II en los astrocitos de hembras. N=6-7. Diferencias significativas: ** $p<0,01$ respecto del grupo control.

Por último, el tratamiento con G1 no moduló la autofagia de los astrocitos de los machos (Figuras 12A-12C). En el caso de las hembras, el G1 tendió a aumentar los niveles de p62 ($p=0,061$) sin modificar el resto de parámetros analizados (Figuras 12D-12F).

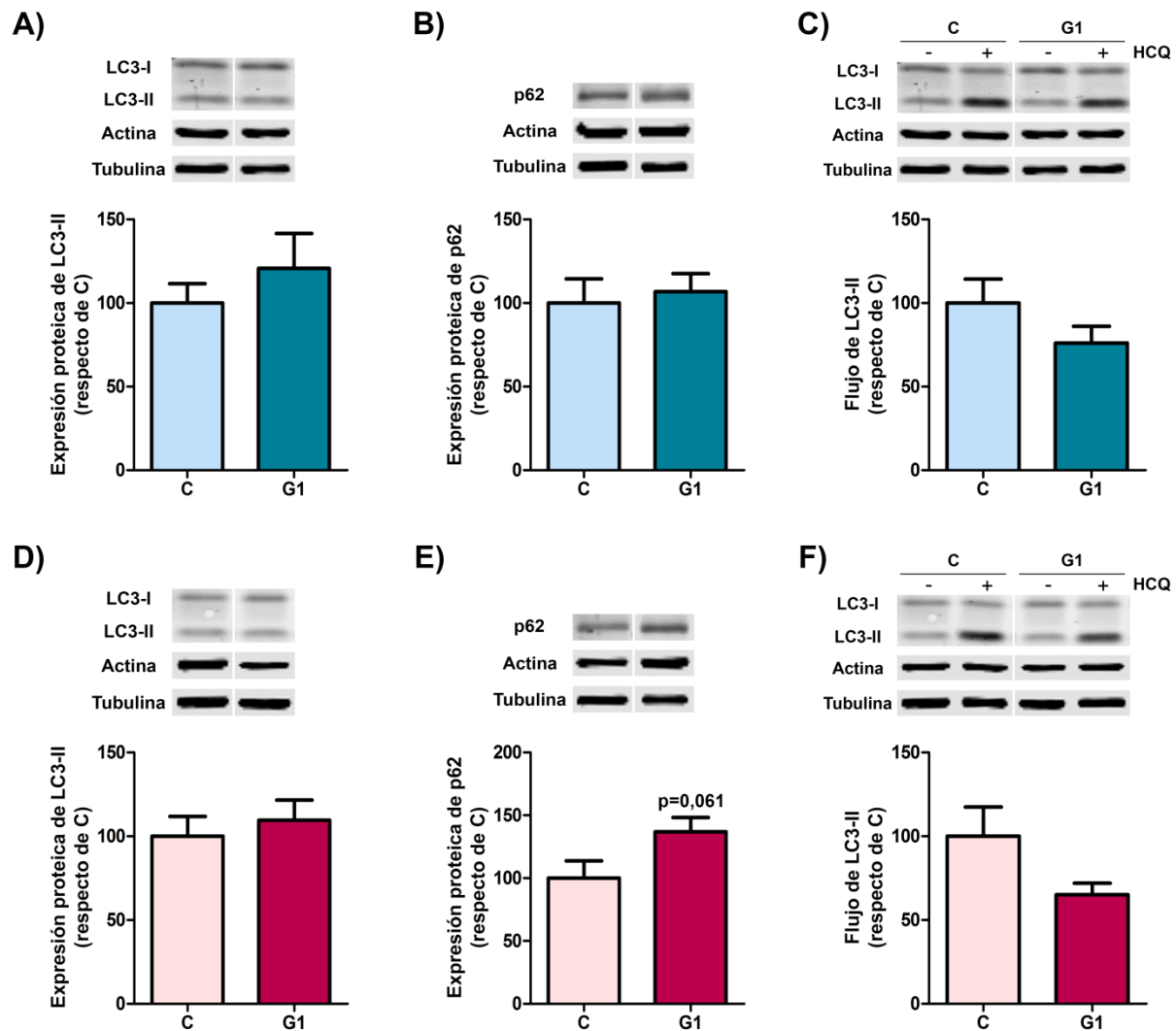


Figura 12. La estimulación específica del receptor GPER no regula la autofagia en los astrocitos. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con G1 (agonista del GPER) durante 4 horas. A) Niveles de proteína LC3-II en los astrocitos de machos. B) Niveles de proteína p62 en los astrocitos de machos. C) Flujo de LC3-II en los astrocitos de machos, cuantificado como el ratio de los niveles de LC3-II en las muestras con HCQ respecto a las muestras sin HCQ del mismo grupo experimental. D) Niveles de proteína LC3-II en los astrocitos de hembras. E) Niveles de proteína p62 en los astrocitos de hembras. F) Flujo de LC3-II en los astrocitos de hembras. N=7. No se detectaron diferencias significativas.

Estos resultados muestran que ninguno de los agonistas de los ER es capaz de mimetizar por sí mismo los efectos del estradiol en los cultivos de astrocitos de los machos. En el caso de las hembras, sólo los agonistas de $ER\alpha$ y $ER\beta$ imitan algunos de los efectos del estradiol. Por tanto, estos

resultados sugieren que el estradiol ejerce sus efectos sobre la autofagia al estimular simultáneamente los diferentes ER en los astrocitos.

3. Caracterización de los efectos del PA en astrocitos

3.1. El PA modula la autofagia en los astrocitos

Debido a que el PA regula la autofagia de las neuronas *in vitro* (Portovedo *et al.* 2015, Hernández-Cáceres *et al.* 2019), se evaluó si este ácido graso también podía modificarla en los astrocitos. Para ello, los cultivos primarios de astrocitos fueron tratados con diferentes dosis de PA (250 y 500 μM) durante 24 horas y se analizaron diversos parámetros autofágicos.

En primer lugar, se midieron los niveles de LC3-II mediante Western blot. El tratamiento con PA incrementó los niveles de LC3-II tanto en los astrocitos de los machos como de las hembras, siendo significativas las diferencias con ambas dosis de PA en los machos y con la dosis más alta en las hembras (Figura 13A).

Como ya se ha indicado, el aumento en los niveles de LC3-II puede estar asociado a un incremento en la formación de autofagosomas o a una menor degradación de los mismos. Para diferenciar entre estas dos causas, se midieron los niveles de proteína de p62. Ambas dosis de PA incrementaron los niveles de p62 tanto en los astrocitos de los machos como de las hembras (Figura 13B).

Además de medir los niveles de proteína de LC3-II y p62, se evaluó si el PA regulaba su transcripción. LC3 y p62 se encuentran codificados por los genes *Map1lc3b* y *Sqstm1* respectivamente. La transcripción de *Map1lc3b* se vio afectada por el tratamiento con PA tanto en los astrocitos de los machos como de las hembras. La dosis de PA 500 μM disminuyó significativamente la transcripción de *Map1lc3b* en los astrocitos de las hembras. En el caso de los machos, esta disminución no resultó estadísticamente significativa ($p=0,054$ respecto al grupo control) (Figura 13C). La transcripción de *Sqstm1* también se vio alterada por PA en los astrocitos de ambos sexos. En las hembras, las dos dosis de PA incrementaron significativamente los niveles de ARNm de *Sqstm1*, mientras que en los machos sólo lo hizo la dosis de PA 500 μM (Figura 13D). Estos resultados muestran que el tratamiento con PA durante 24 horas no sólo afecta a los niveles de proteína de LC3 y p62, sino que también regula su transcripción en los astrocitos.

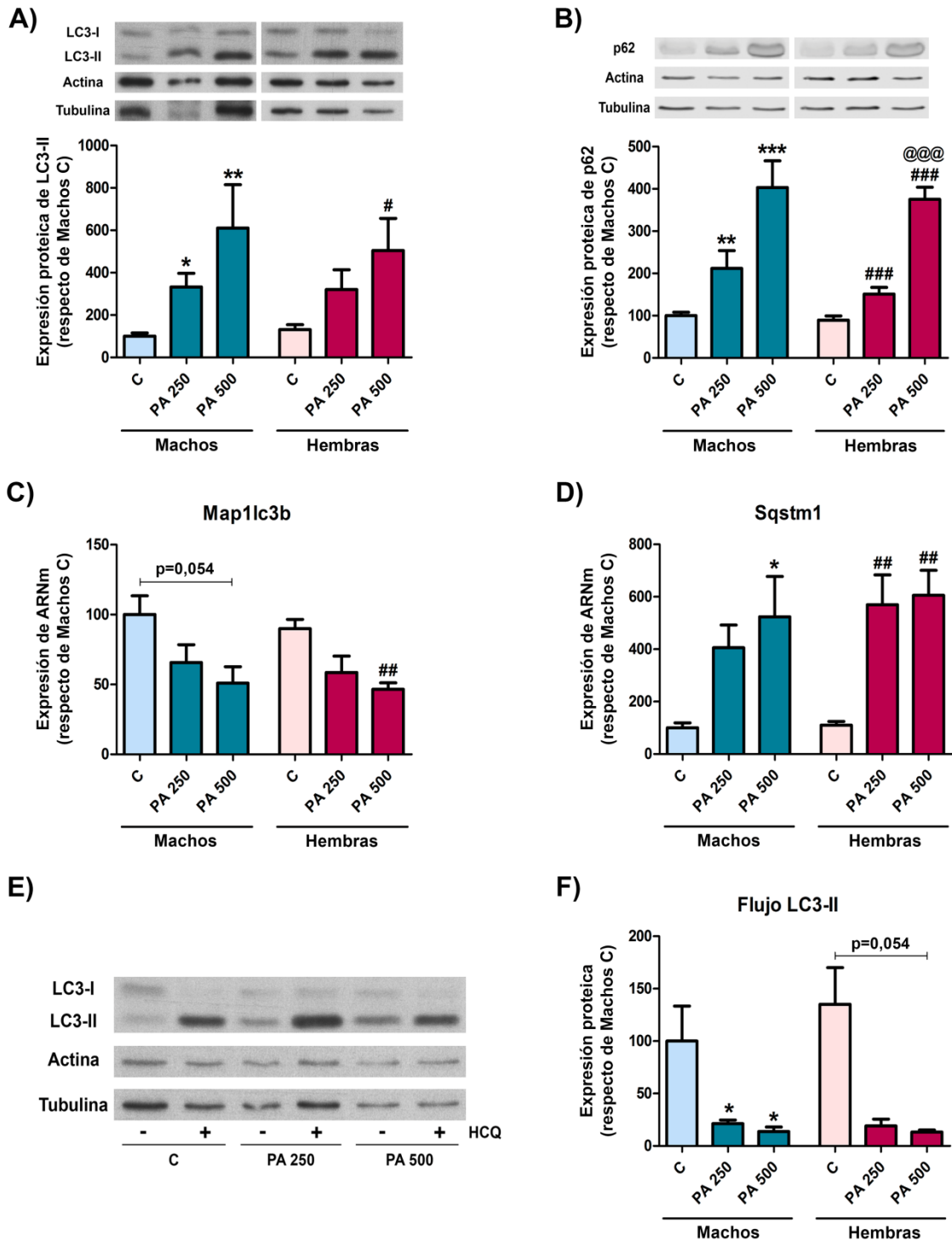


Figura 13. El tratamiento con PA bloquea la autofagia en los cultivos de astrocitos. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con vehículo (C), PA 250 μ M (PA 250) y PA 500 μ M (PA 500) durante 24 horas. A) Niveles de proteína LC3-II. B) Niveles de proteína p62. C) Niveles de ARNm de Maplc31b. D) Niveles de ARNm de Sqstm1. E) Imagen representativa de la detección de LC3-II para calcular el flujo de LC3-II. F) Flujo de LC3-II cuantificado como el ratio de los niveles de LC3-II en las muestras con HCQ respecto a las muestras sin HCQ del mismo grupo experimental. N=5-10. Diferencias significativas: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto de machos C; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ respecto de hembras C; @@@ $p < 0,001$ respecto de hembras PA 250.

La presencia de elevados niveles de LC3-II y p62 tras el tratamiento con PA podría indicar un bloqueo de la autofagia en los astrocitos. Para confirmarlo, se midió el flujo de autofagia usando HCQ. Los astrocitos fueron tratados con PA 250 y 500 μ M durante 24 horas y se les añadió HCQ en las últimas 4,5 horas de tratamiento. A continuación, se midieron los niveles de LC3-II por Western blot para determinar el flujo de autofagia. El tratamiento con PA modificó el flujo de LC3-II en los astrocitos de los machos y de las hembras. Ambas dosis de PA disminuyeron el flujo de LC3-II en los machos, mientras que en las hembras sólo la dosis más alta tendió a disminuir este parámetro ($p=0,054$ respecto al control) (Figuras 13E-13F). Estos resultados demuestran que el tratamiento con PA disminuye la acumulación de LC3-II inducida por la HCQ. Debido a ello, el incremento observado en los niveles de LC3-II no está asociado a una mayor formación de autofagosomas sino a una menor degradación. Este aspecto se ve apoyado por el incremento de los niveles de p62 tras el tratamiento con PA.

A partir de estos análisis, se puede concluir que el PA genera un bloqueo en la autofagia de los astrocitos en cultivo.

3.2. El PA induce una respuesta inflamatoria en los astrocitos

Se ha demostrado que la autofagia interviene en la respuesta inflamatoria y que el PA es capaz de modular la inflamación en astrocitos (Gupta *et al.* 2012, Qian *et al.* 2017). Por este motivo, se evaluó la transcripción de diversas citoquinas proinflamatorias en los astrocitos tratados con PA 250 y 500 μ M durante 24 horas.

El tratamiento con PA modificó la transcripción de TNF- α , aunque sólo lo hizo de manera significativa en los astrocitos de los machos. Así, la dosis de PA 500 μ M incrementó los niveles de ARNm de TNF- α en machos. También se detectaron diferencias entre ambos sexos, siendo menor la transcripción de TNF- α en los astrocitos de las hembras control que la de los machos control (Figura 14A).

La transcripción de IL-1 β también se vio modificada por el PA en los astrocitos de los machos. La dosis más elevada de PA aumentó los niveles de transcripción de IL-1 β , aunque no se alcanzó una diferencia significativa ($p=0,050$ respecto al grupo control). Además, se detectaron diferencias en la transcripción de IL-1 β entre los astrocitos de machos y hembras. Concretamente, los niveles de ARNm de IL-1 β fueron más elevados en los astrocitos de los machos control y los tratados con PA 500 μ M que en los correspondientes grupos de las hembras (Figura 14B).

A diferencia de las citoquinas anteriores, la transcripción de IL-6 se vio afectada por el tratamiento con PA tanto en los astrocitos de los machos como de las hembras. Mientras que en los

machos sólo la dosis de PA 500 μM incrementó significativamente los niveles de ARNm de IL-6, ambas dosis de PA tuvieron este efecto en las hembras. Además, los niveles de transcripción de IL-6 aumentaron en función de la dosis de PA (Figura 14C).

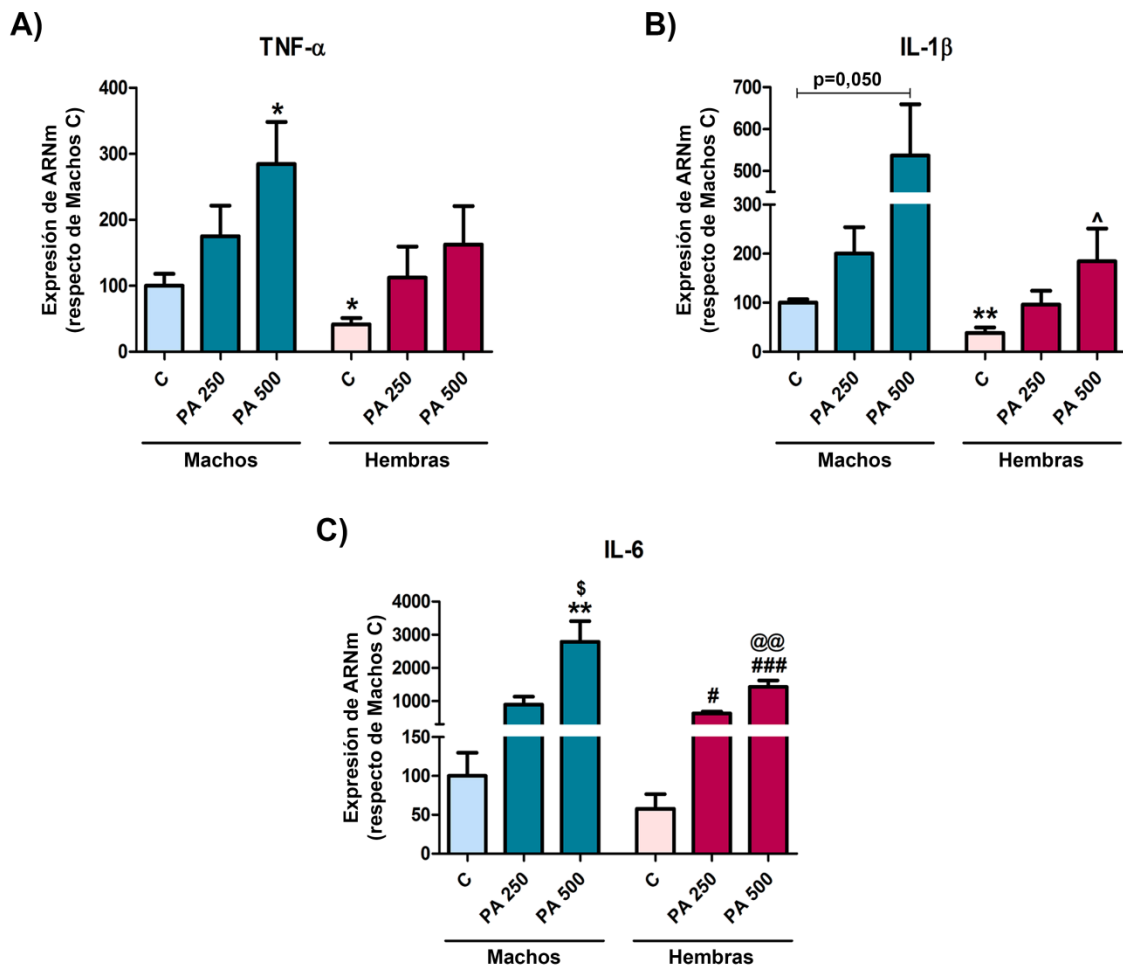


Figura 14. Los niveles de citoquinas proinflamatorias se incrementan en los cultivos de astrocitos tras el tratamiento con PA. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con vehículo (C), PA 250 μM (PA 250) y PA 500 μM (PA 500) durante 24 horas. A) Niveles de ARNm de TNF- α . B) Niveles de ARNm de IL-1 β . C) Niveles de ARNm de IL-6. N=4-5. Diferencias significativas: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto de machos C; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ respecto de hembras C; \$ $p < 0,05$ respecto de machos PA 250; @@ $p < 0,01$ respecto de hembras PA 250; ^ $p < 0,05$ respecto de machos PA 500.

Estos resultados demuestran que el tratamiento con PA durante 24 horas genera una respuesta inflamatoria en los cultivos de astrocitos. Así, el PA incrementa la transcripción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, aunque existen diferencias en la respuesta de los astrocitos de ambos sexos.

3.3. El PA disminuye la viabilidad de los astrocitos

Para evaluar si el PA alteraba la viabilidad de los astrocitos tras 24 horas de tratamiento, se realizaron ensayos de MTT y FDA. El ensayo de MTT mostró que las dosis de PA 250 y 500 μM redujeron drásticamente la viabilidad de los astrocitos de machos y hembras. Además, el efecto del PA 250 μM fue más acusado en los astrocitos de los machos que de las hembras (Figura 15A). La fuerte disminución de la viabilidad inducida por PA en ambos sexos fue corroborada posteriormente mediante un ensayo de FDA (Figura 15B).

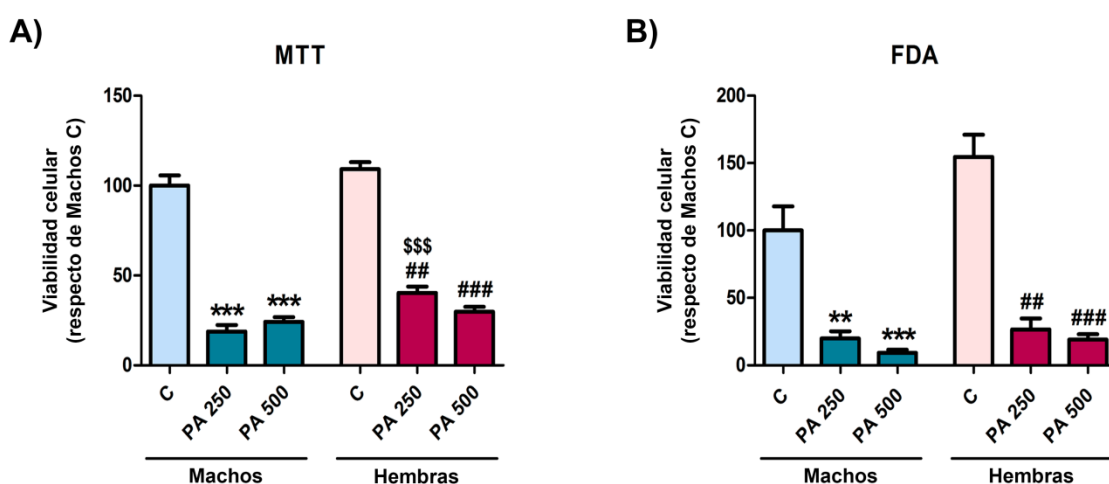


Figura 15. El tratamiento con PA reduce la viabilidad celular de los astrocitos. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con vehículo (C), PA 250 μM (PA 250) y PA 500 μM (PA 500) durante 24 horas. A) Viabilidad celular determinada mediante el ensayo de MTT. B) Viabilidad celular determinada mediante el ensayo de FDA. N=5. Diferencias significativas: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto de machos C; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ respecto de hembras C; \$\$\$ $p < 0,001$ respecto de machos PA 250.

A partir de estos resultados se puede concluir que el tratamiento con PA durante 24 horas disminuye la viabilidad de los astrocitos.

3.4. El PA reduce la transcripción de los ER en los astrocitos de las hembras

Existe una importante relación entre el metabolismo cerebral de los lípidos y los estrógenos (Morselli *et al.* 2018), por lo que se evaluó si la transcripción de los ER se veía modificada por el PA. Para ello, los astrocitos fueron tratados con PA durante 24 horas y se determinaron los niveles de ARNm de ER α , ER β y GPER. Ambas dosis de PA disminuyeron significativamente la transcripción de todos los ER, aunque sólo en los astrocitos de las hembras (Figura 16).

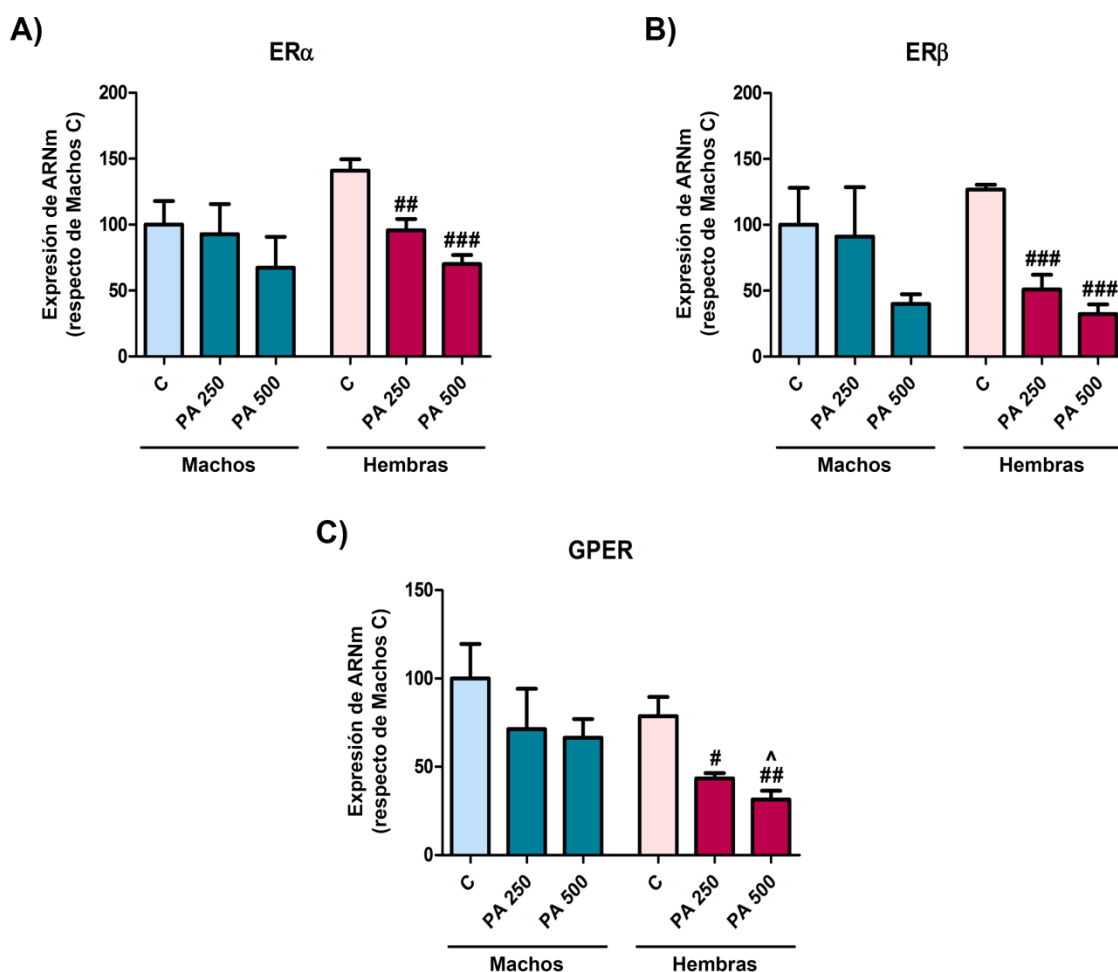


Figura 16. El PA disminuye la transcripción de los ER en los astrocitos de las hembras. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con vehículo (C), PA 250 μ M (PA 250) y PA 500 μ M (PA 500) durante 24 horas. A) Niveles de ARNm de ER α . B) Niveles de ARNm de ER β . C) Niveles de ARNm de GPER. N=4-5. Diferencias significativas: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ respecto de hembras C; ^ $p < 0,05$ respecto de machos PA 500.

3.5. El tratamiento con compuestos estrogénicos no impide la pérdida de viabilidad de los astrocitos inducida por el PA

Debido a las propiedades antiinflamatorias del estradiol descritas en los astrocitos (Acáz-Fonseca *et al.* 2014) y a los cambios en la transcripción de los ER inducidos por el PA, se estudió si el tratamiento con estradiol podía prevenir el efecto deletéreo del PA. Los astrocitos fueron tratados con estradiol durante 24 horas y expuestos a PA 250 μ M junto con estradiol durante 24 horas más. Posteriormente, la viabilidad celular se determinó mediante un ensayo de MTT. Como ya se ha descrito previamente, el PA disminuyó la viabilidad de los astrocitos de machos y hembras. El estradiol por sí mismo no modificó los niveles de viabilidad de los astrocitos. En el caso de los astrocitos de los machos, el estradiol revirtió parcialmente la pérdida de viabilidad celular. Sin embargo, este efecto no se observó en los astrocitos de las hembras (Figura 17A).

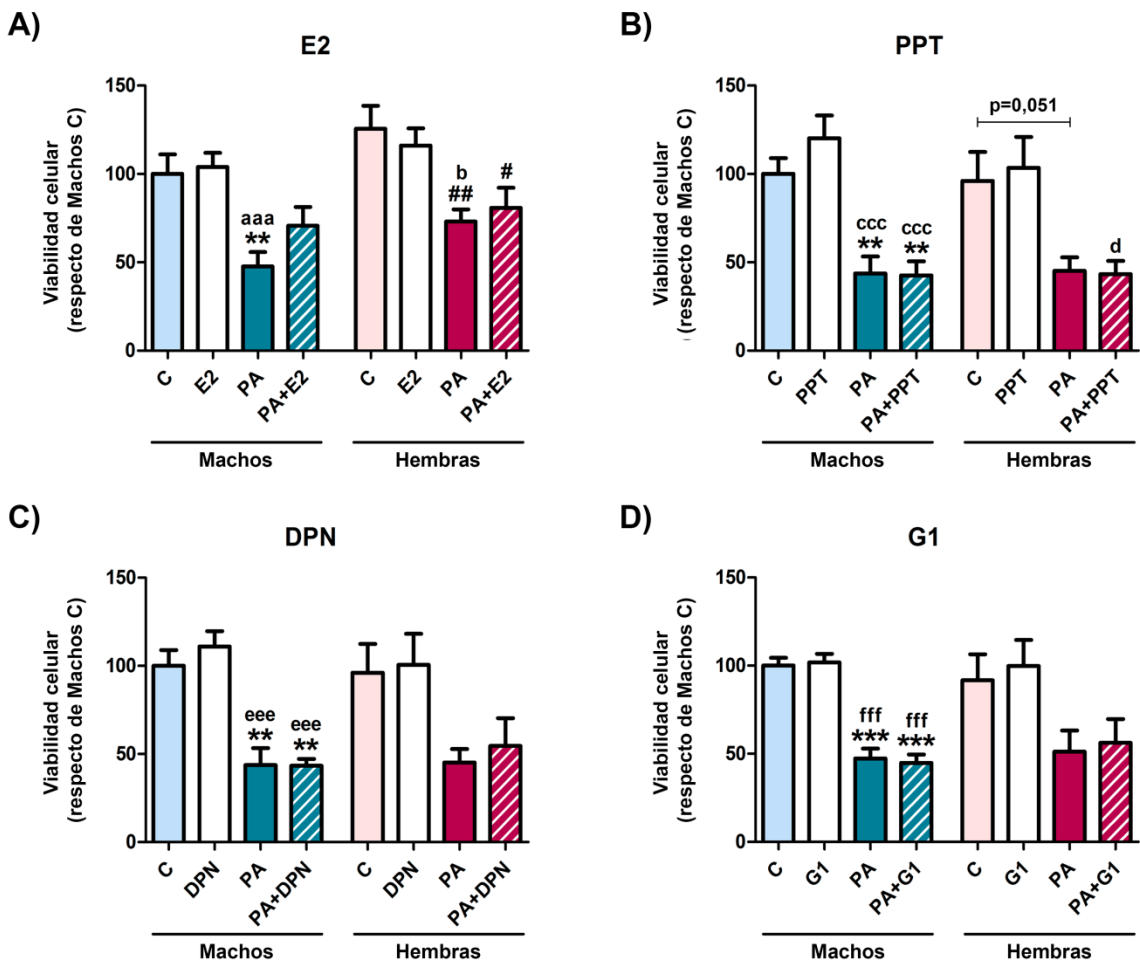


Figura 17. La pérdida de viabilidad inducida por el PA en los astrocitos no es revertida por el tratamiento con compuestos estrogénicos. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con estradiol (E2) y los agonistas específicos de los ER (PPT, DPN y G1) durante 24 horas. A continuación, fueron expuestos a PA 250 μ M (PA) en combinación con los compuestos estrogénicos durante 24 horas más. La viabilidad se determinó mediante un ensayo de MTT. A) Viabilidad celular tras el tratamiento con E2. B) Viabilidad celular tras el tratamiento con PPT (agonista de ER α). C) Viabilidad celular tras el tratamiento con DPN (agonista de ER β). D) Viabilidad celular tras el tratamiento con G1 (agonista de GPER). N=4-10. Diferencias significativas: ** p<0,01, *** p<0,001 respecto de machos C; # p<0,05, ##p<0,01 respecto de hembras C; aaa p<0,001 respecto de machos E2; b p<0,05 respecto de hembras E2; ccc p<0,001 respecto de machos PPT; d p<0,05 respecto de hembras PPT; eee p<0,001 respecto de machos DPN; fff p<0,001 respecto de machos G1.

Se ha descrito que la activación de los diferentes ER puede inducir efectos transcripcionales opuestos (Lewis *et al.* 2008, Grassi *et al.* 2013). Por este motivo, el efecto del estradiol puede verse enmascarado al activar a los distintos ER simultáneamente. Como el estradiol protegía parcialmente a los astrocitos del efecto deletéreo del PA, se analizó el efecto mediado por cada uno de los ER. Para ello los astrocitos fueron tratados durante 24 horas con los agonistas específicos de cada uno de los receptores: PPT (agonista de ER α), DPN (agonista de ER β) y G1 (agonista de GPER). A continuación, se añadió PA 250 μ M en presencia de los agonistas durante 24 horas más. Los resultados del ensayo de

MTT demostraron que ninguno de los agonistas fue capaz de impedir el efecto deletéreo del PA (Figuras 17B-17D).

También se estudió el posible papel protector del estradiol endógeno ante el efecto del PA. Los astrocitos fueron tratados durante 24 horas con letrozol, un inhibidor de la enzima aromatasa que impide la síntesis de estradiol. A continuación, fueron expuestos al PA 250 μ M en combinación con letrozol durante 24 horas adicionales. Con esta aproximación se quería comprobar si la pérdida del estradiol endógeno incrementaba el daño inducido por el PA. Sin embargo, el tratamiento con letrozol no modificó la viabilidad de los astrocitos tratados con PA (Figura 18).

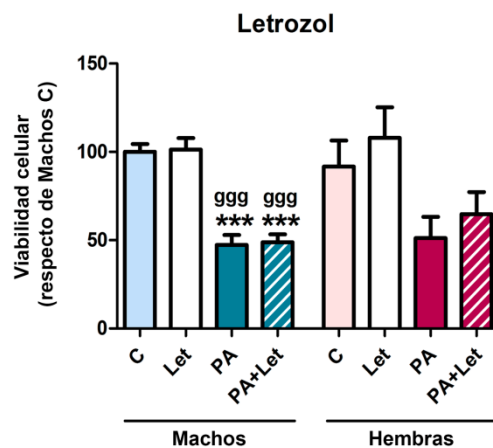


Figura 18. El estradiol endógeno no protege a los astrocitos del efecto deletéreo del PA. Los cultivos de astrocitos fueron tratados letrozol (Let) durante 24 horas. A continuación, fueron expuestos al PA 250 μ M (PA) en combinación con letrozol durante 24 horas más y se midió la viabilidad celular mediante MTT. N=4-5. Diferencias significativas: *** $p < 0,001$ respecto de machos C; ggg $p < 0,001$ respecto de machos Let.

A partir de estos resultados, se puede concluir que el efecto del PA sobre los astrocitos es tan marcado que los compuestos estrogénicos no pueden ejercer su efecto protector.

3.6. La inducción de la autofagia mediante rapamicina no protege a los astrocitos del efecto inflamatorio y deletéreo del PA

Como el tratamiento con PA producía el bloqueo de la autofagia, la respuesta inflamatoria y la pérdida de viabilidad en los astrocitos, se evaluó si la inducción de la autofagia podía impedir estos efectos. Para ello, los astrocitos fueron tratados con rapamicina, un inductor de la autofagia que ejerce un efecto inhibitorio sobre mTOR (Blommaert *et al.* 1995).

En primer lugar, se comprobó que el tratamiento con rapamicina estaba inhibiendo a mTOR. Los niveles de fosforilación de mTOR después del tratamiento con rapamicina habían disminuido, lo que confirmaba la inhibición de mTOR. Además, los niveles de LC3-II se incrementaron tras el

tratamiento con rapamicina, lo que demostraba la inducción de la autofagia por parte de este compuesto (Figura 19A).

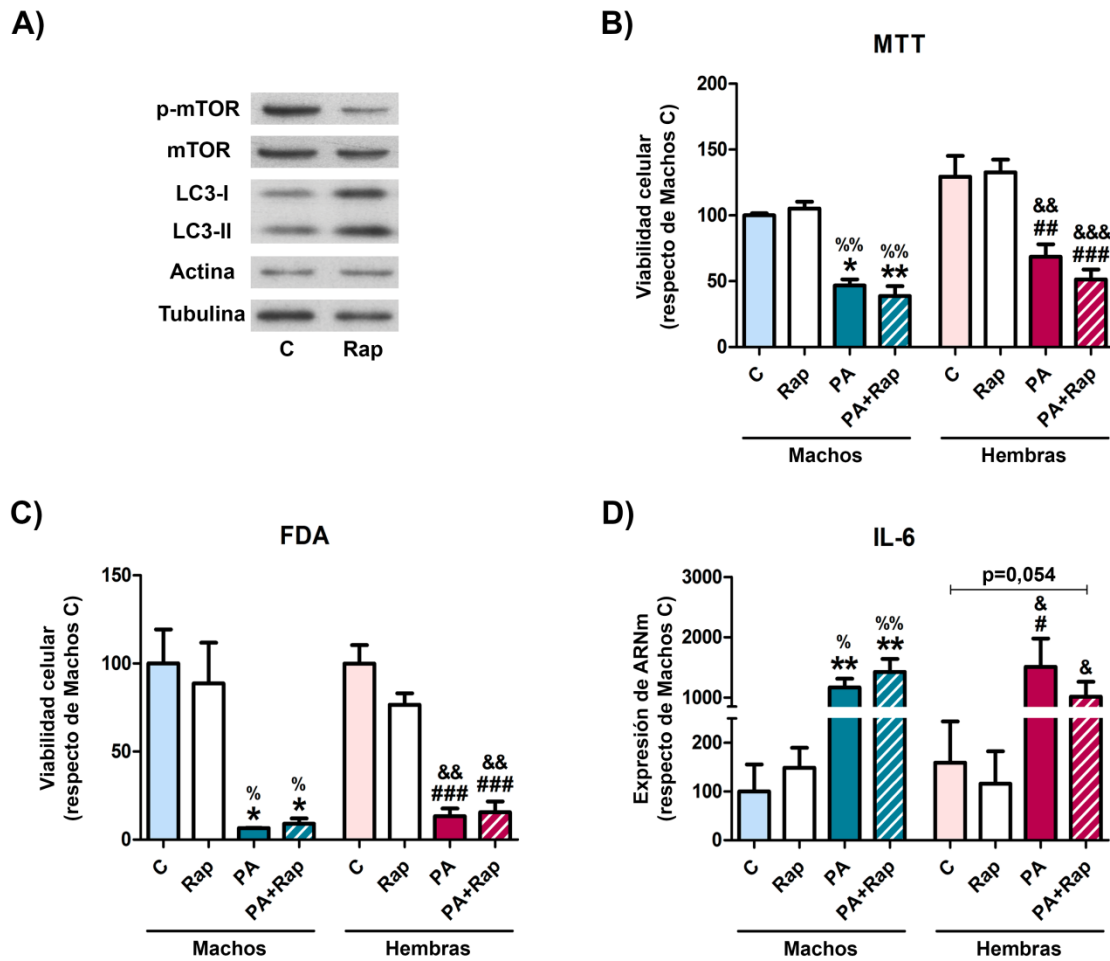


Figura 19. La inducción de la autofagia mediante rapamicina no impide el efecto inflamatorio y deletéreo del PA en los astrocitos. Los cultivos de astrocitos fueron tratados durante 2 horas con rapamicina (Rap). A continuación, fueron expuestos a PA 250 μ M (PA) en combinación con rapamicina durante 24 horas. A) Imagen representativa de la detección de mTOR fosforilado (p-mTOR) y LC3-II para comprobar la inhibición de mTOR y la inducción de la autofagia en estas condiciones experimentales. B) Viabilidad celular determinada por un ensayo de MTT. C) Viabilidad celular determinada mediante un ensayo de FDA. D) Niveles de ARNm de IL-6. N=3-5. Diferencias significativas: * p<0,05, ** p<0,01 respecto de machos C; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 respecto de hembras C; % p<0,05, %% p<0,01 respecto de machos Rap; & p<0,05, && p<0,01, &&& p<0,001 respecto de hembras Rap.

Una vez verificado su efecto, los astrocitos fueron tratados con rapamicina durante 2 horas y, posteriormente, con la combinación de PA 250 μ M y rapamicina durante 24 horas. A continuación, se determinó la viabilidad de los astrocitos mediante los ensayos de MTT y FDA. Ambas técnicas mostraron que la rapamicina no modificaba los niveles de viabilidad en las células tratadas con vehículo ni en las tratadas con PA (Figuras 19B-19C). Esto se observó tanto en los astrocitos de los machos como de las hembras. Además, se midió la transcripción de IL-6 para determinar si la

inducción de autofagia por rapamicina podía compensar el efecto proinflamatorio del PA. Sin embargo, el tratamiento con rapamicina no disminuyó de manera significativa el incremento de transcripción de IL-6 inducido por el PA en los astrocitos de ambos sexos (Figura 19D).

Estos resultados indican que la inducción de la autofagia mediante rapamicina no es suficiente para contrarrestar el efecto proinflamatorio y deletéreo del PA.

3.7. El PA bloquea la autofagia antes de inducir inflamación y pérdida de viabilidad en los astrocitos

El tratamiento con PA durante 24 horas produce alteraciones en la autofagia junto con una gran pérdida de viabilidad en los astrocitos. Estudiar cambios en autofagia en presencia de muerte celular no es recomendable debido a que existe una estrecha relación entre ambos procesos (Fitzwalter y Thorburn 2015). Por tanto, lo más adecuado es evaluar si existen alteraciones de la autofagia en ausencia de muerte celular. Para ello, los astrocitos fueron tratados con PA durante 4,5 horas. En estas condiciones experimentales, el PA no modificaba ni la viabilidad (Figura 20A) ni la transcripción de citoquinas proinflamatorias en los astrocitos (Figuras 20B-20D).

Una vez determinada la ausencia de muerte en los cultivos de astrocitos tras 4,5 horas de tratamiento con PA, se evaluaron los diferentes parámetros de autofagia. En primer lugar, se midieron los niveles de LC3-II por Western blot. El tratamiento con PA sólo tuvo un efecto significativo en los astrocitos de las hembras, en los cuales la dosis de PA 500 μ M aumentó los niveles de LC3-II respecto al control (Figura 21A).

En el caso de la expresión de p62, esta se vio incrementada tanto en los astrocitos de machos como de hembras tras el tratamiento con PA. Mientras que ambas dosis de PA aumentaron los niveles de p62 en los machos, en las hembras sólo la dosis más elevada los incrementó significativamente (Figura 21B). Este resultado fue corroborado tras observar la acumulación de p62 inducida por PA en los cultivos de astrocitos mediante inmunocitoquímica. En el grupo control, el marcaje puntuado de p62 se distribuía de manera uniforme por todo el citoplasma de los astrocitos. El tratamiento con PA inducía un incremento en el tamaño de los puntos inmunoreactivos para p62, que se agrupaban en determinadas regiones del citoplasma (Figura 22).

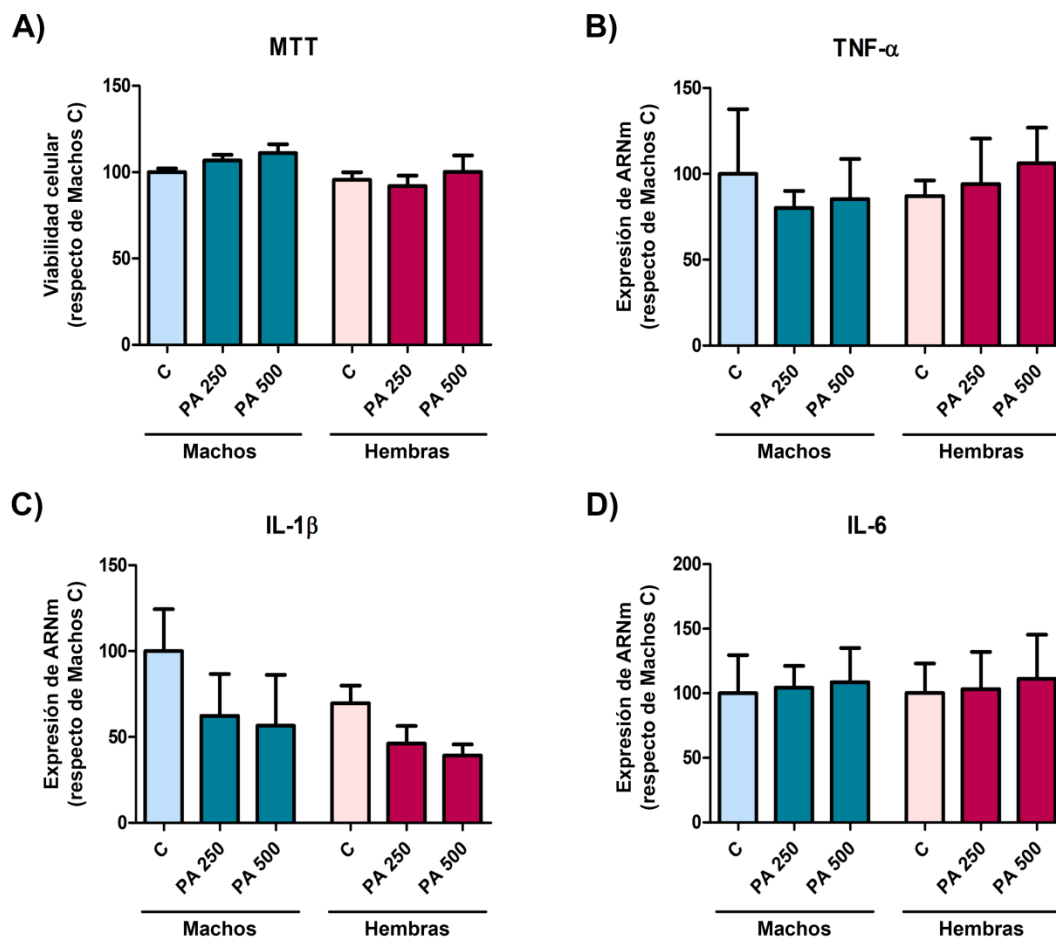


Figura 20. La viabilidad celular y la transcripción de citoquinas proinflamatorias no se ven modificadas tras el tratamiento con PA durante 4,5 horas. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con vehículo (C), PA 250 μ M (PA 250) y PA 500 μ M (PA 500) durante 4,5 horas. A) Viabilidad celular determinada mediante un ensayo de MTT. B) Niveles de ARNm de TNF- α . C) Niveles de ARNm de IL-1 β . D) Niveles de ARNm de IL-6. N=4-5. No se detectaron diferencias significativas.

Además, se evaluó la transcripción de los genes Map1lc3b y Sqstm1. El tratamiento con PA durante 4,5 horas no modificó la transcripción de Map1lc3b en los astrocitos de ninguno de los sexos (Figura 21C). Respecto a Sqstm1, el PA 250 μ M tendió a aumentar su transcripción en los astrocitos de los machos pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,056$ respecto al control) (Figura 21D). Por tanto, a diferencia de lo que ocurría con el tratamiento prolongado de PA, el tratamiento durante 4,5 horas no modificó la transcripción de estos genes de autofagia.

Junto a estos parámetros se estudió el flujo de autofagia de los astrocitos. Para ello, los astrocitos fueron tratados con PA 250 y 500 μ M en combinación con HCQ durante 4,5 horas y se midieron los niveles de LC3-II por Western blot para calcular el flujo de autofagia. Ambas dosis de PA disminuyeron el flujo de autofagia tanto en los astrocitos de los machos como de las hembras (Figuras 21E-21F).

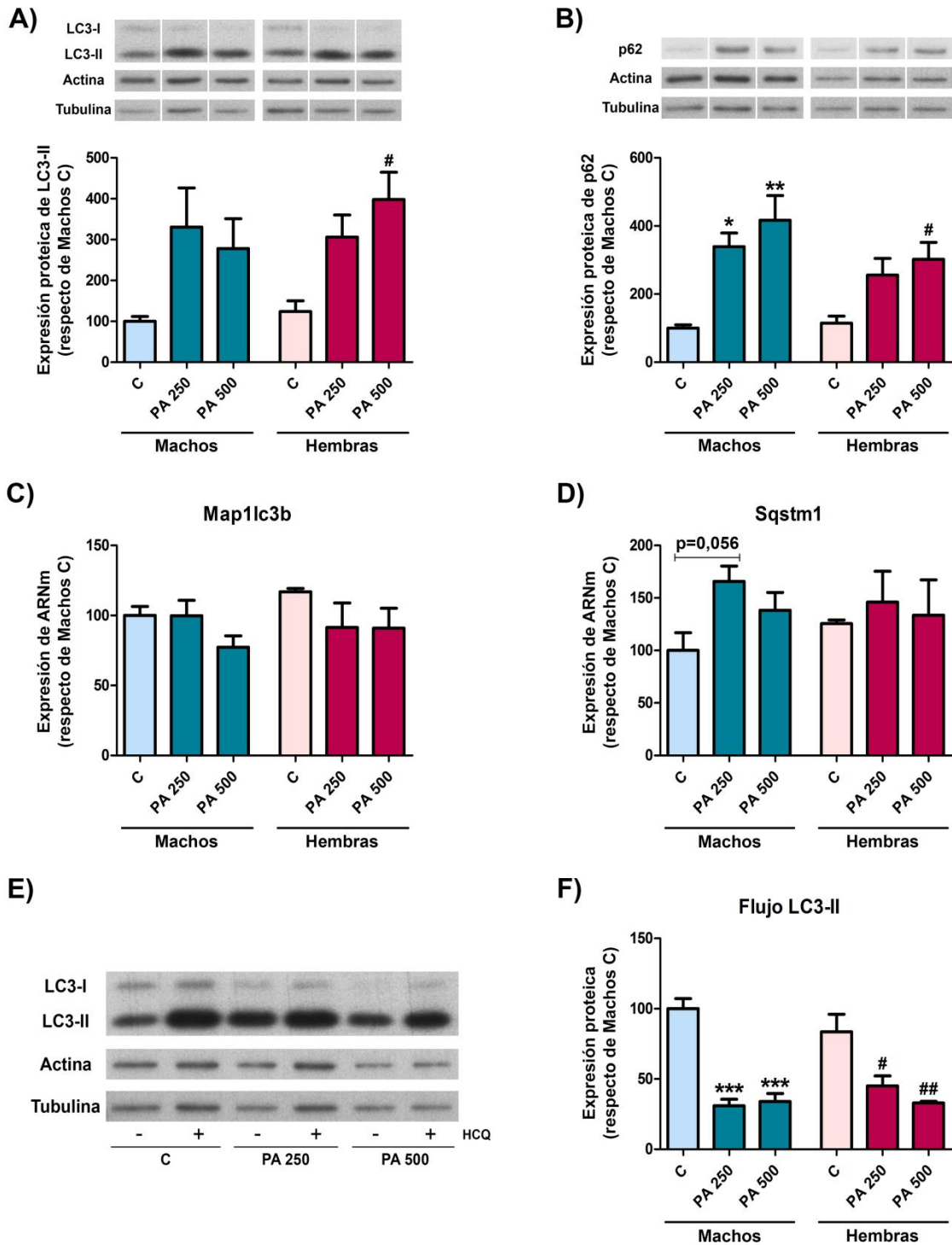


Figura 21. El PA induce un bloqueo de la autofagia en los astrocitos tras 4,5 horas de tratamiento. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con vehículo (C), PA 250 μ M (PA 250) y PA 500 μ M (PA 500) durante 4,5 horas. A) Niveles de proteína LC3-II. B) Niveles de proteína p62. C) Niveles de ARNm de Maplc31b. D) Niveles de ARNm de Sqstm1. E) Imagen representativa de la detección de LC3-II para calcular el flujo de LC3-II. F) Flujo de LC3-II cuantificado como el ratio de los niveles de LC3-II en las muestras con HCQ respecto a las muestras sin HCQ del mismo grupo experimental. N=5-10. Diferencias significativas: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto de machos C; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ respecto de hembras C.

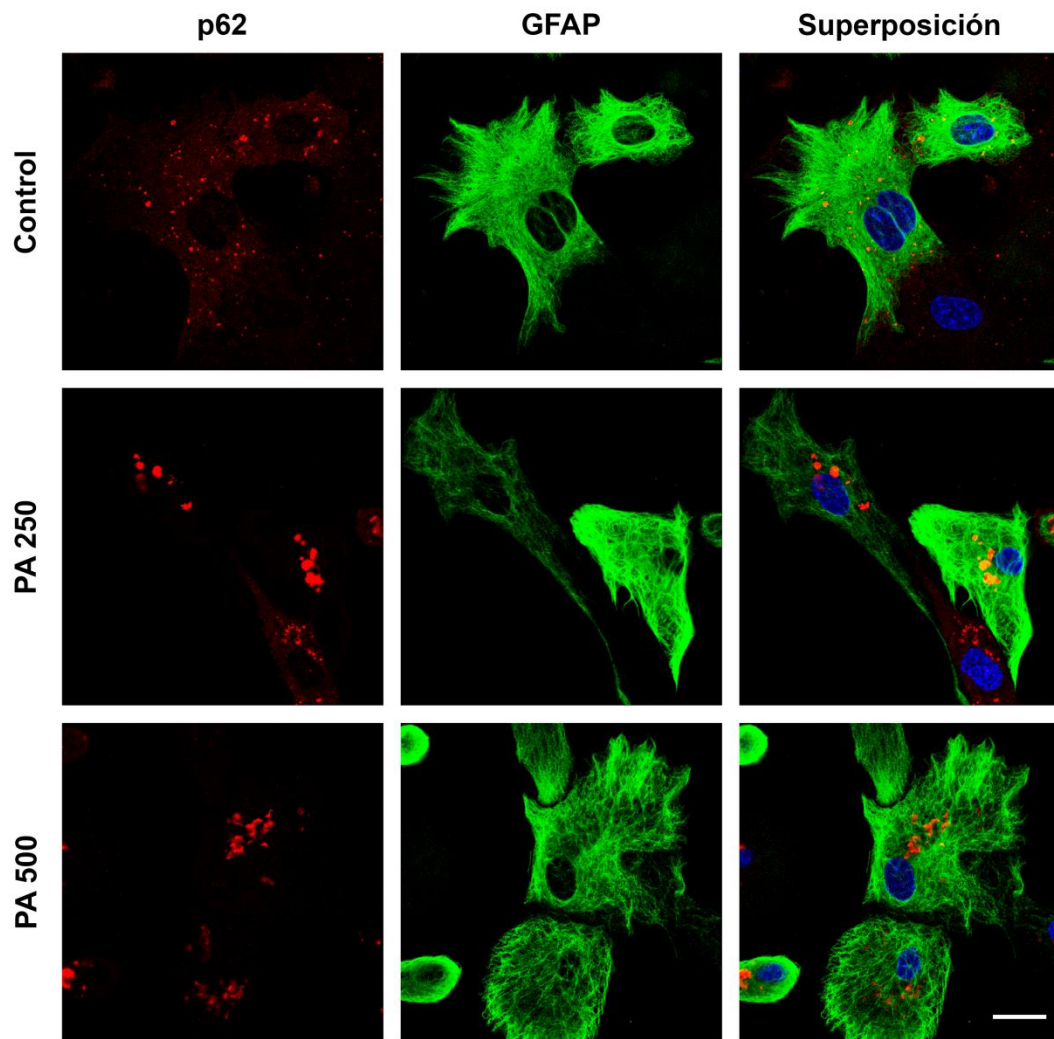


Figura 22. El tratamiento con PA durante 4,5 horas induce la acumulación de p62 en los astrocitos. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con vehículo (C), PA 250 μM (PA 250) y PA 500 μM (PA 500) durante 4,5 horas. Mediante inmunocitoquímica se detectaron las proteínas p62 (rojo), marcador de autofagia, y GFAP (verde), marcador de astrocitos. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Se muestran imágenes representativas de cada uno de los grupos experimentales en los astrocitos de los machos. En los astrocitos de las hembras se observaron los mismos resultados. Las imágenes muestran una distribución homogénea de p62 en el citoplasma del grupo control, mientras que el tratamiento con PA incrementa el tamaño de los puntos inmunorreactivos y favorece la acumulación del marcaje en zonas concretas del citoplasma. N=3. Barra de escala: 20 μm .

Estos resultados demuestran que el bloqueo de la autofagia en los astrocitos precede a otros de los efectos generados por el PA como son la inflamación y la pérdida de viabilidad.

3.8. El bloqueo de la autofagia no modifica la viabilidad ni la expresión de CHOP de los astrocitos

Debido a que el bloqueo de la autofagia es el primer efecto que el PA induce en los astrocitos, se evaluó si dicho bloqueo podía producir por sí mismo la pérdida de viabilidad en los astrocitos. Para bloquear la autofagia, los astrocitos fueron tratados con HCQ (inhibe la fusión de los lisosomas con los autofagosomas) durante 4,5 horas. A continuación, se midieron los niveles de LC3-II por Western blot para comprobar que la autofagia estaba siendo bloqueada. El tratamiento con HCQ producía la acumulación de LC3-II tanto en los astrocitos de los machos como de las hembras, lo que corroboraba el bloqueo de la autofagia (Figura 23A).

A continuación, los astrocitos fueron tratados con HCQ en ausencia y presencia de PA durante 4,5 o 24 horas, y se evaluó su viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Tras 4,5 horas de tratamiento, la HCQ no indujo cambios en la viabilidad de los astrocitos control ni los tratados con PA (Figuras 23B-23C). Tras 24 horas, el tratamiento con HCQ tampoco modificó la supervivencia de los astrocitos control. Sin embargo, la combinación de HCQ y PA disminuyó la viabilidad celular respecto a los astrocitos tratados únicamente con PA (Figuras 23D-23E). Estos resultados demuestran que el bloqueo de la autofagia con HCQ no genera por sí mismo una pérdida de viabilidad en los astrocitos, aunque incrementa el efecto deletéreo del PA.

Se ha descrito que existe una estrecha relación entre los mecanismos de autofagia, apoptosis y estrés de retículo endoplásmico (Sano y Reed 2013). Por este motivo, se estudió si el tratamiento con PA inducía estrés de retículo endoplásmico en los astrocitos, así como el efecto del bloqueo de la autofagia en esta respuesta. Para ello, se midieron los niveles de la proteína homóloga a C/EBP (CHOP, del inglés *C/EBP-homologous protein*). CHOP es un factor de transcripción que interviene en la apoptosis inducida tras un daño severo del retículo endoplásmico (Oyadomari y Mori 2004). Los astrocitos fueron tratados con PA 250 μ M durante 4,5 y 24 horas, tras lo que se analizó la inducción de CHOP por Western blot. Además, se empleó la tunicamicina, un inductor de estrés de retículo endoplásmico, como control positivo de la expresión de CHOP.

El tratamiento con PA durante 4,5 horas no indujo la expresión de CHOP en los astrocitos. Sin embargo, tanto el tratamiento prolongado con PA (24 horas) como con tunicamicina (6 horas) incrementaron la expresión de CHOP. Además, los astrocitos fueron tratados con HCQ para analizar si el bloqueo de la autofagia inducía la expresión de CHOP. El tratamiento con HCQ no modificó la expresión de CHOP por sí mismo ni en combinación con PA (Figura 24).

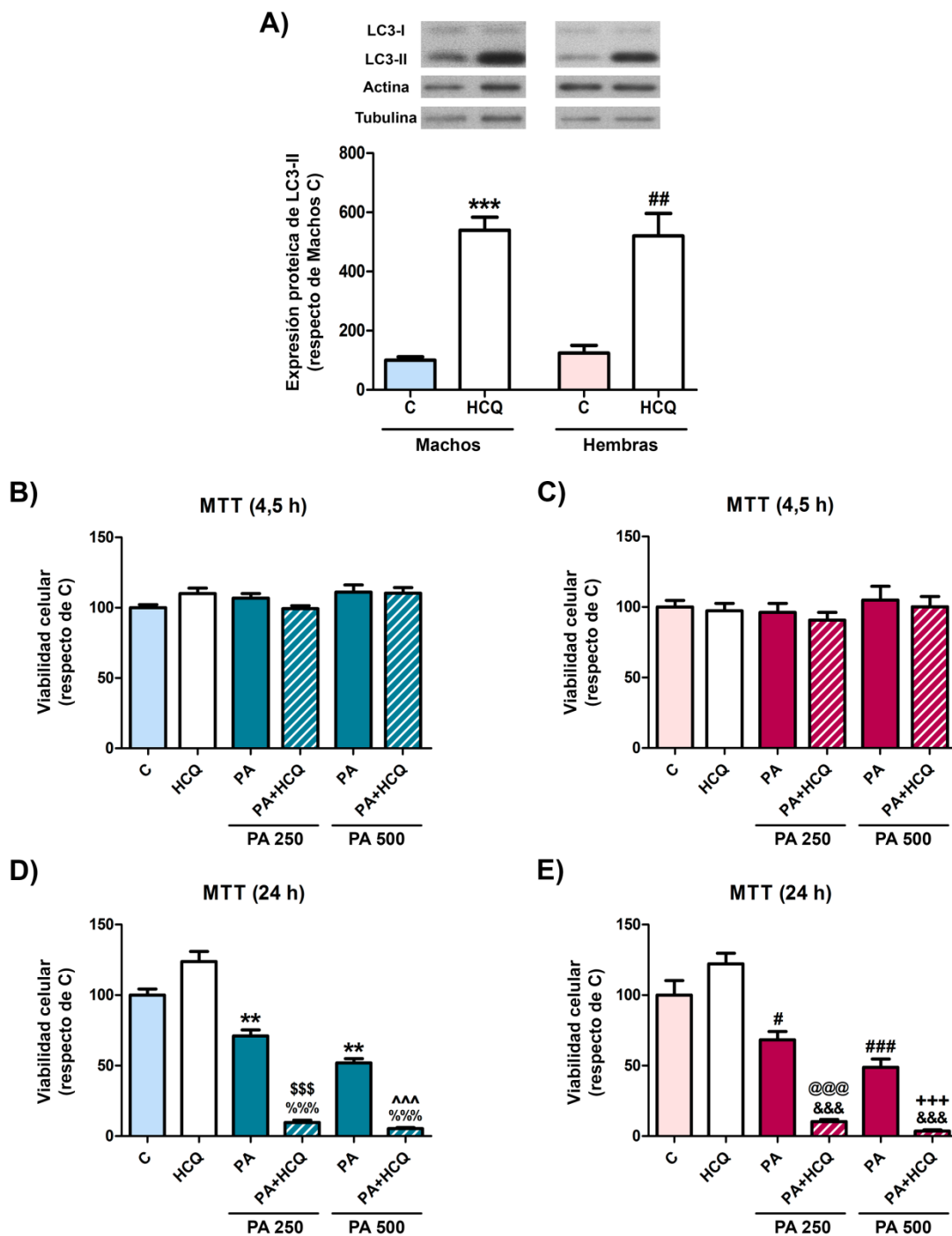


Figura 23. El bloqueo de la autofagia mediante HCQ no induce muerte celular por sí mismo pero incrementa el efecto deletéreo del PA. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con vehículo (C), HCQ, PA 250 μ M (PA 250) y PA 500 μ M (PA 500) durante 4,5 o 24 horas y se determinó la viabilidad celular mediante MTT. A) Niveles de proteína LC3-II tras 4,5 horas de tratamiento con HCQ. B) Viabilidad celular tras 4,5 horas en los machos. C) Viabilidad tras 4,5 horas en las hembras. D) Viabilidad tras 24 horas en los machos. E) Viabilidad tras 24 horas en las hembras. N=4-5. Diferencias significativas: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto de machos C; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ respecto de hembras C; \$\$\$ $p < 0,001$ respecto de machos PA 250; @@@ $p < 0,001$ respecto de hembras PA 250; ^^ ^ $p < 0,001$ respecto de machos PA 500; +++ $p < 0,001$ respecto de hembras PA 500; %%% $p < 0,001$ respecto de machos HCQ; &&& $p < 0,001$ respecto de hembras HCQ.

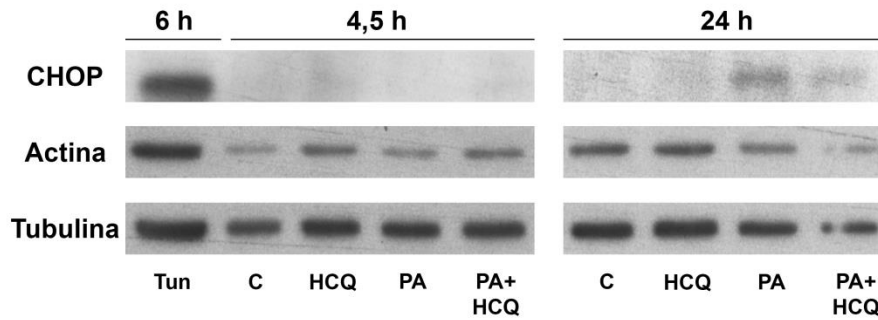


Figura 24. El tratamiento con PA induce la expresión de CHOP en los astrocitos tras 24 horas de tratamiento. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con vehículo (C), tunicamicina (Tun), PA 250 μ M (PA) y HCQ, y se analizó la expresión de CHOP mediante Western blot. Se muestra una imagen representativa de la detección de CHOP por Western blot. El experimento se repitió cuatro veces y se observaron los mismos resultados en los astrocitos de los machos y de las hembras.

A partir de estos resultados, podemos concluir que el tratamiento prolongado con PA induce una respuesta de estrés de retículo endoplásmico en los astrocitos. Sin embargo, el bloqueo de la autofagia no es suficiente para generar este tipo de respuesta en los astrocitos.

3.9. El PA modifica la organización y actividad mitocondrial en los astrocitos

Diferentes estudios han demostrado que el PA disminuye el potencial de membrana mitocondrial y favorece la producción de ROS en astrocitos (Wong *et al.* 2014, González-Giraldo *et al.* 2018). Debido a la alteración de la función mitocondrial que genera el PA, se evaluó si este ácido graso modificaba también la organización y la actividad de los complejos mitocondriales.

Los astrocitos fueron tratados con PA durante 4,5 horas. A continuación, las mitocondrias fueron extraídas y solubilizadas en digitonina para ser separadas mediante BN-PAGE. Esta técnica permite separar las proteínas a la vez que se mantienen sus interacciones proteína-proteína, un aspecto fundamental para el estudio de los supercomplejos (Jha *et al.* 2016). Una vez realizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana para la inmunodetección específica de los distintos complejos mitocondriales o se determinó su actividad enzimática en el propio gel.

En primer lugar, se corroboró la especificidad de las bandas obtenidas para los complejos I, III y IV (Figura 25). Para ello se compararon muestras de astrocitos procedentes de las cepas CD1 y C57BL/6J. Estas cepas presentan una organización de los complejos mitocondriales diferente debido a que contienen isoformas distintas de la proteína SCAF1, encargada de la interacción entre los complejos III y IV para que formen supercomplejos (Lapiente-Brun *et al.* 2013). Los ratones de la cepa C57BL/6J poseen la isoforma corta no funcional, por lo que en esta cepa no se forman los supercomplejos I+III₂+IV y III₂+IV en tejidos como el cerebro (Cogliati *et al.* 2016).

Para visualizar el complejo I se inmunodetectó la subunidad de 75 kDa de la NADH:ubiquinona oxidorreductasa (NDUFS1). En los astrocitos de ambas cepas de ratones, se observaron las bandas correspondientes al complejo I libre (menor peso molecular) y los supercomplejos formados entre el complejo I y III (supercomplejos I+III₂ y I₂+III₂). Además, en los astrocitos de la cepa CD1 apareció una banda adicional que se corresponde con los supercomplejos I+III₂+IV gracias a la presencia de SCAF1 funcional en esta cepa (Figura 25A).

A continuación, se evaluó la presencia de los complejos III y IV mediante la inmunodetección de proteína 2 del complejo ubiquinol-citocromo-c reductasa (UQCRC2) y la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (MTCO1) respectivamente (Figura 25B). En ambas cepas de ratón, se observó la presencia del complejo IV libre (banda con menor peso molecular), y los dímeros del complejo IV y del complejo III (ambos presentan el mismo peso molecular). Por encima de estas bandas, aparecieron los supercomplejos III₂+IV, que sólo están presentes en la cepa CD1 ya que posee SCAF1 funcional.

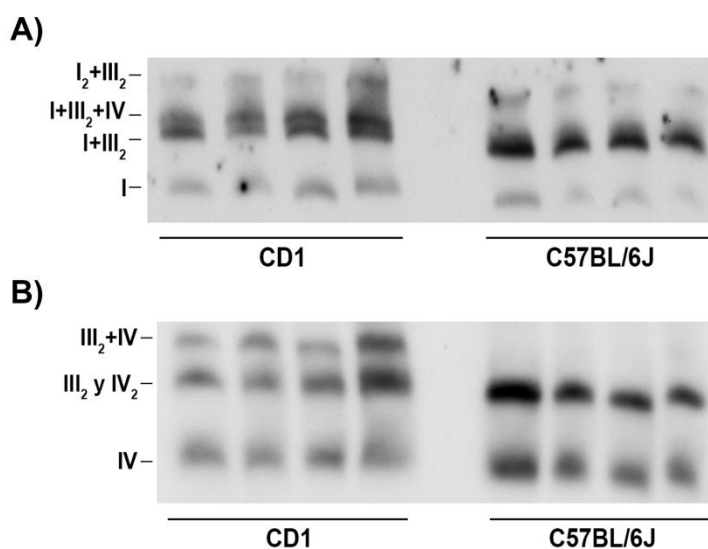


Figura 25. Diferencias en la organización de los supercomplejos mitocondriales en cultivos de astrocitos de las cepas de ratón CD1 y C57BL/6J. Las proteínas mitocondriales se separaron mediante BN-PAGE y se transfirieron a membranas para su posterior inmunodetección. Debido a la presencia de diferentes isoformas de SCAF1 entre ambas cepas de ratón, no se produce el ensamblaje entre el complejo III y IV en los astrocitos de la cepa C57BL/6J. A) Visualización del complejo I mediante la inmunodetección de la proteína NDUFS1. B) Visualización de los complejos III y IV mediante la inmunodetección de las proteínas UQCRC2 y MTCO1. N=4.

Una vez identificadas las bandas obtenidas, se estudió el efecto del PA en la organización de los complejos mitocondriales de los astrocitos de la cepa CD1 (Figuras 26-28).

En primer lugar se determinó la proporción de complejo I libre respecto al complejo I que estaba asociado a los supercomplejos. El tratamiento con PA incrementó la cantidad de complejo I

libre tanto en los astrocitos de los machos como de las hembras. También se observó un efecto general del sexo en los niveles de complejo I libre. Dichos niveles eran superiores en los astrocitos de las hembras respecto de los machos (independientemente del grupo experimental). Sin embargo, las diferencias entre los grupos no llegaron a ser estadísticamente significativas (Figuras 26A-26B).

En relación con la actividad del complejo I, se determinó la actividad de la parte libre respecto a la asociada a los supercomplejos. De esta forma, la actividad del complejo I libre fue superior en los astrocitos de las hembras respecto a la de los machos (tanto en los grupos control como los tratados con PA). Además, el tratamiento con PA incrementó la actividad del complejo I libre en los astrocitos de ambos sexos (Figuras 26C-26D).

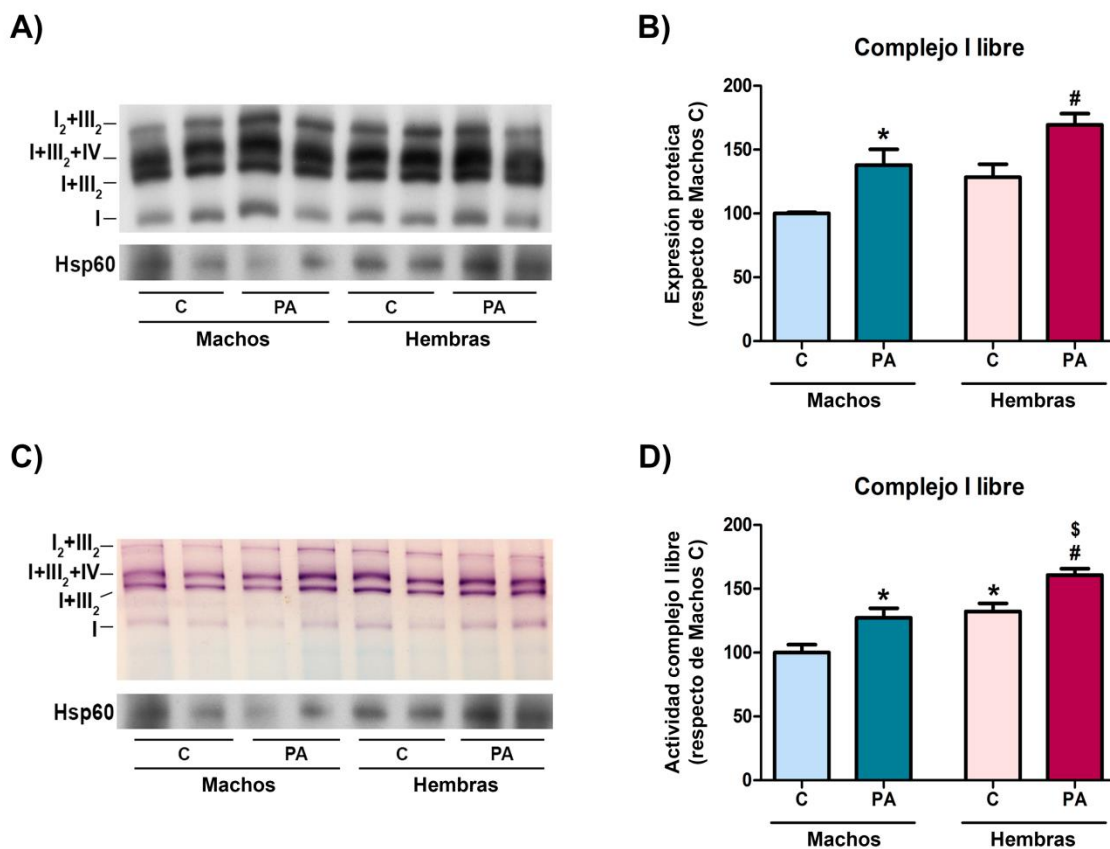


Figura 26. El tratamiento con PA incrementa los niveles de complejo I libre así como su actividad en los astrocitos. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con vehículo (C) y PA 250 μ M (PA) durante 4,5horas. A continuación, las proteínas mitocondriales se aislaron y se separaron mediante BN-PAGE para determinar la organización mitocondrial en supercomplejos y la actividad del complejo I. A) Visualización del complejo I mediante la inmunodetección de la proteína NDUFS1. B) Cuantificación del complejo I libre respecto a la cantidad de complejo I asociado a los supercomplejos. C) Ensayo de actividad en gel del complejo I. D) Cuantificación de la actividad del complejo I libre respecto a la actividad presente en el complejo I asociado a supercomplejos. N=3. Diferencias significativas: * $p < 0,05$ respecto de machos C; # $p < 0,05$ respecto de hembras C; \$ $p < 0,05$ respecto de machos PA.

Respecto al complejo IV, también se analizó la parte del complejo que se encontraba libre respecto al asociado a los supercomplejos. El tratamiento con PA disminuyó la presencia del complejo IV libre en los astrocitos de machos y hembras, sin que existiesen diferencias sexuales en este parámetro (Figuras 27A-27B).

Para analizar el complejo II se midió la expresión de la subunidad A de la succinato deshidrogenasa (SDHA). El complejo II no se asocia a ninguno de los complejos de la cadena transportadora de electrones (Kovářová *et al.* 2013, Chaban *et al.* 2014), por lo que se observó una única banda en la membrana. La cuantificación de SDHA reveló que la expresión del complejo II era mayor en las hembras control que en los machos control. Además, el PA incrementó la expresión del dicho complejo en los astrocitos de ambos sexos (Figuras 27C-27D).

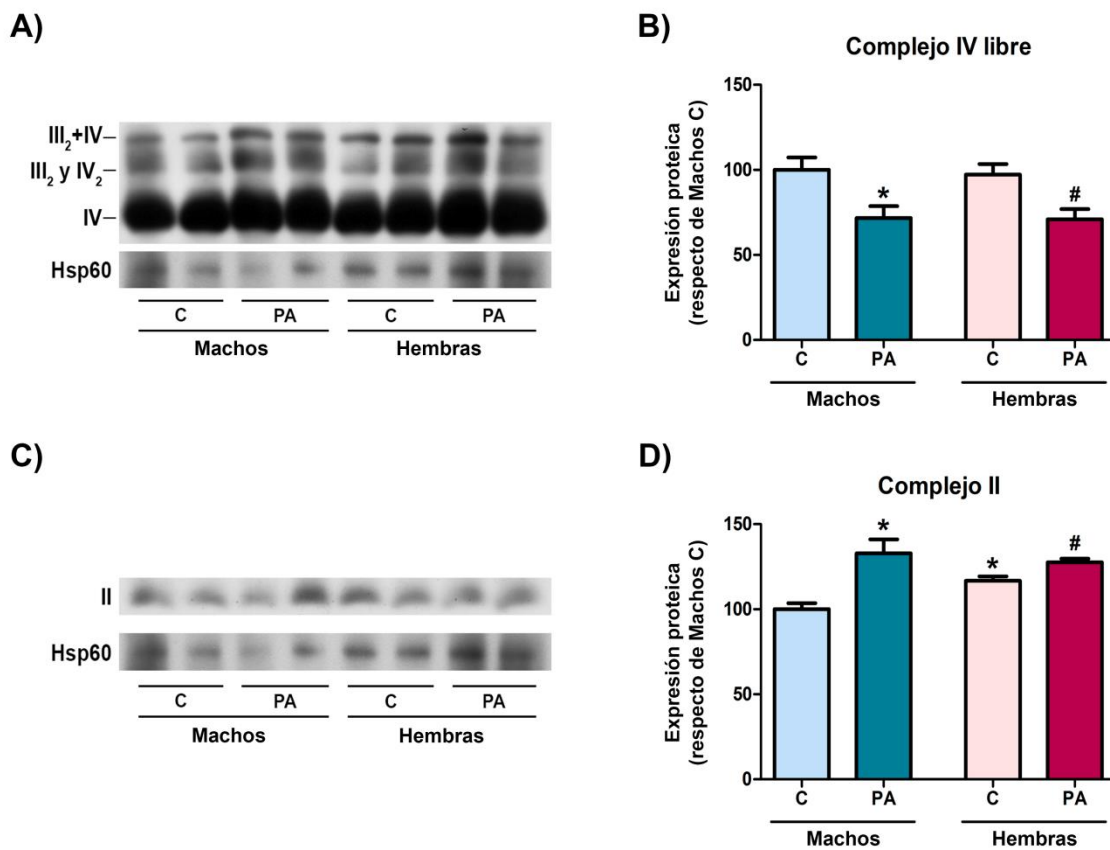


Figura 27. El tratamiento con PA disminuye la presencia del complejo IV libre a la vez que aumenta los niveles de complejo II en los astrocitos. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con vehículo (C) y PA 250 μ M (PA) durante 4,5 horas. A continuación, las proteínas mitocondriales se aislaron y separaron mediante BN-PAGE para determinar la organización mitocondrial en supercomplejos. A) Visualización del complejo IV mediante la inmunodetección simultánea de las proteínas MTCO1 (complejo IV) y UQCRC2 (complejo III). B) Cuantificación del complejo IV libre respecto a la cantidad de complejo IV asociado a los supercomplejos. C) Visualización del complejo II mediante la inmunodetección de SDHA. D) Cuantificación de los niveles de complejo II. N=3. Diferencias significativas: * $p < 0,05$ respecto de machos C; # $p < 0,05$ respecto de hembras C.

Por último, se caracterizó la organización de la ATP sintasa mediante el análisis de la subunidad β de la ATP sintasa (ATPB). Esta subunidad forma parte del complejo F_1 de la enzima y participa en su actividad catalítica. Se observaron distintas bandas en función del tiempo de exposición del revelado que se corresponden con el complejo F_1 libre, y los monómeros, dímeros y oligómeros de ATP sintasa (por orden creciente de peso molecular). A continuación, se cuantificó la proporción de complejo F_1 libre respecto a la ATP sintasa organizada en oligómeros. El tratamiento con PA disminuyó la proporción de complejo F_1 libre en los astrocitos de ambos sexos, aunque dicha reducción sólo fue estadísticamente significativa en los machos ($p=0,050$ en las hembras) (Figuras 28A-28B).

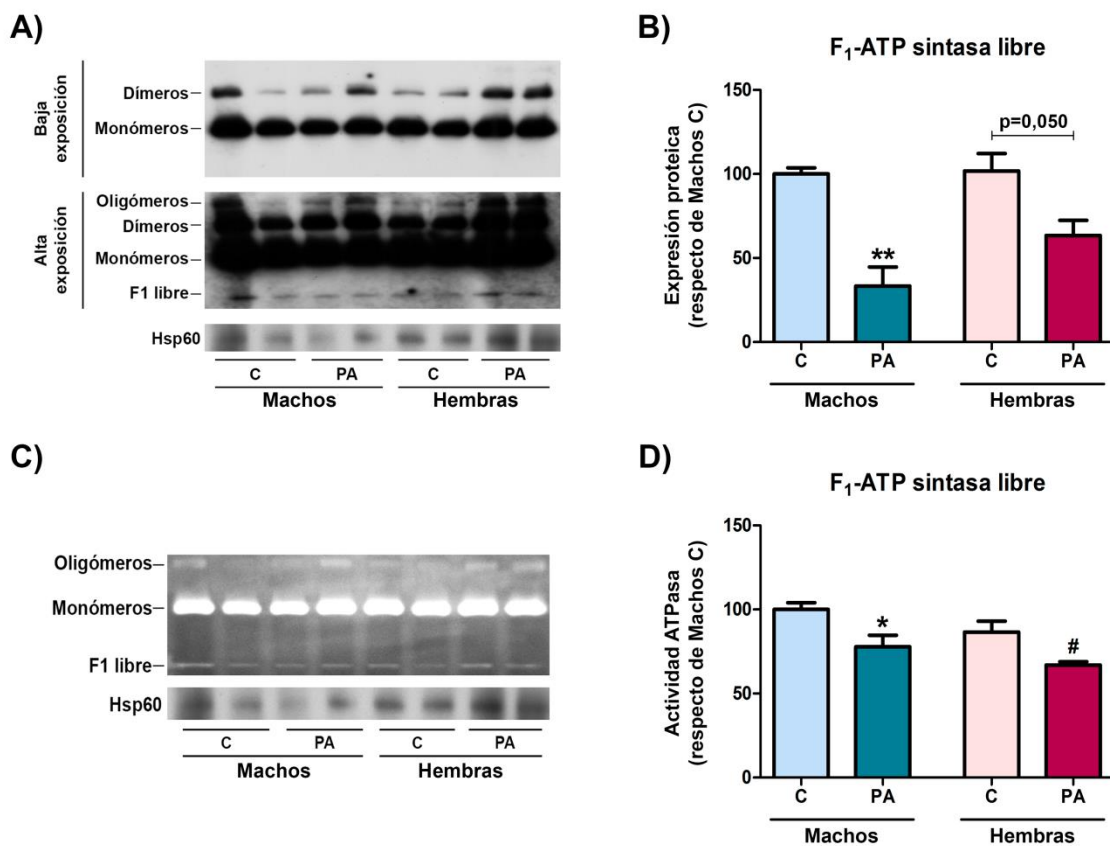


Figura 28. El tratamiento con PA disminuye los niveles y la actividad de la ATP sintasa libre. Los cultivos de astrocitos fueron tratados con vehículo (C) y PA 250 μ M (PA) durante 4,5 horas. A continuación, las proteínas mitocondriales se aislaron y separaron mediante BN-PAGE para determinar la organización y la actividad de la ATP sintasa. A) Visualización de la ATP sintasa mediante la inmunodetección de la subunidad β del complejo F_1 (ATPB). B) Cuantificación de los niveles de complejo F_1 libre respecto a la ATP sintasa organizada en oligómeros. C) Ensayo de actividad en gel de la ATP sintasa. D) Cuantificación de la actividad enzimática del complejo F_1 libre respecto a la ATP sintasa organizada en oligómeros. N=3. Diferencias significativas: * $p<0,05$; ** $p<0,01$ respecto de machos C; # $p<0,05$ respecto de hembras C.

Por último, se analizó la actividad de la ATP sintasa mediante un ensayo de actividad en gel. Se cuantificó la actividad de cada una de las bandas y se determinó la actividad del complejo F₁ libre respecto a la actividad de los oligómeros de ATP sintasa. El tratamiento con PA disminuyó dicha actividad en los astrocitos de machos y hembras. Además, se detectó un efecto general del sexo debido a que los astrocitos de las hembras mostraron menor actividad que los machos. Sin embargo, las diferencias entre los grupos no fueron significativas (Figuras 28C-28D).

Estos resultados demuestran que el PA es capaz de modificar la organización de los complejos de la cadena respiratoria, así como su actividad. Además, existen diferencias sexuales tanto en la organización como la actividad de los complejos en los astrocitos de manera basal.

4. Análisis de la autofagia en un modelo de consumo agudo de HFD

Diversos estudios han demostrado que la autofagia disminuye en el hipotálamo tras el consumo de HFD a largo plazo (Meng y Cai 2011, Ignacio-Souza *et al.* 2014, Portovedo *et al.* 2015). Sin embargo no se ha explorado si la actividad autofágica se modifica tras un período corto de consumo de HFD, en el que las alteraciones metabólicas periféricas están comenzando a desarrollarse. Además, se desconoce si los astrocitos del hipotálamo modulan su autofagia en respuesta a la HFD.

Por estos motivos, se administró una HFD durante 5 o 15 días a ratones hembra adultos. En primer lugar se caracterizó la respuesta metabólica periférica tras el consumo de este tipo de dieta. A continuación, se analizó la presencia de autofagosomas en el núcleo arcuato del hipotálamo, una región con un importante papel en el control metabólico (Timper y Brüning 2017, García-Cáceres *et al.* 2019).

4.1. La administración de HFD a corto plazo modifica algunos parámetros metabólicos

Para determinar la respuesta metabólica al consumo agudo de HFD, se midieron el peso corporal, la composición corporal (masa grasa y masa magra) y la glucemia al inicio y al fin de la dieta.

Tras 5 días, el peso corporal de los animales no se vio afectado ni por el tiempo ni por el tipo de dieta consumida (Figura 29A). Sin embargo, se detectaron cambios en la composición corporal. Mientras que la masa grasa no se vio modificada de una manera significativa (Figura 29B), la masa magra cambió en función del tiempo y del tipo de dieta administrada. Al finalizar la dieta, la masa magra de los animales control había aumentado respecto al inicio de la dieta. Además, estos niveles eran superiores a los de los animales HFD al finalizar la dieta (Figura 29C). Por último, los niveles de

glucosa disminuyeron de forma general tras la dieta. Esta reducción sólo fue significativa en los animales HFD (Figura 29D).

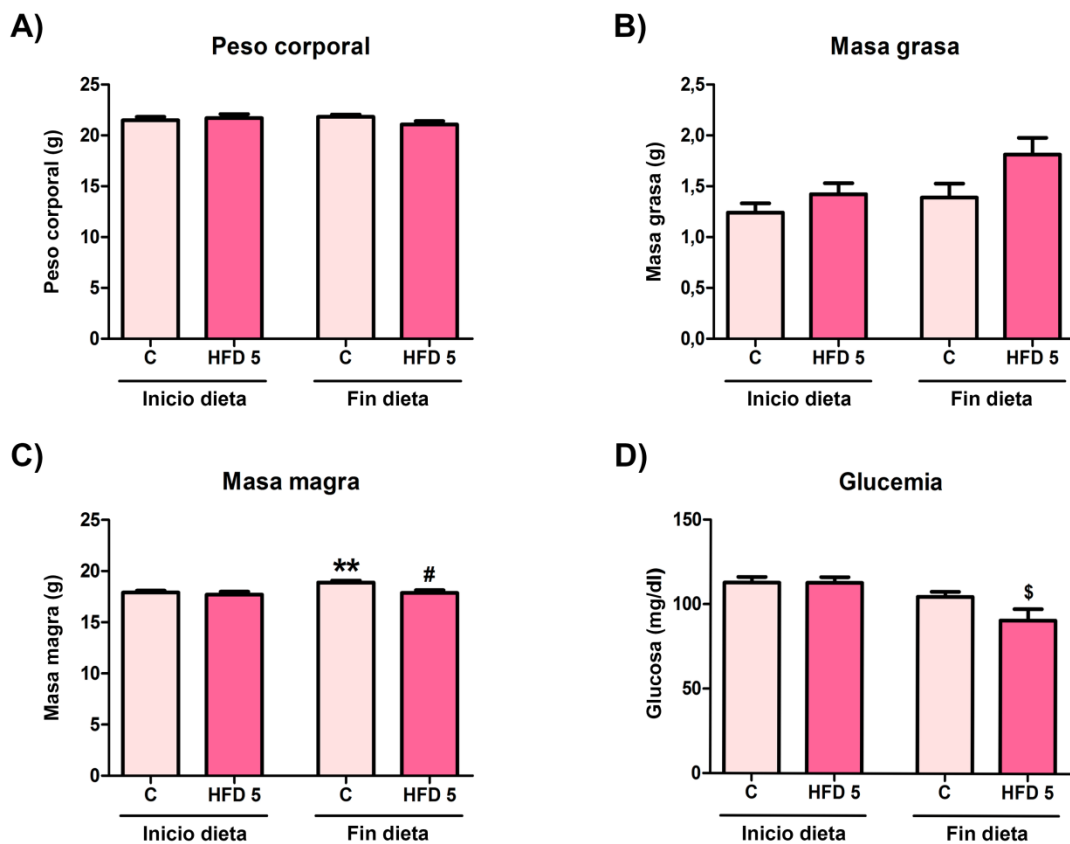


Figura 29. El consumo de HFD durante 5 días apenas modifica los parámetros metabólicos en ratones hembra adultos. Los animales fueron alimentados con dieta control (C) o con HFD (HFD 5) durante 5 días. Los parámetros metabólicos se midieron en ambos grupos experimentales antes de iniciarse la dieta y al finalizarla. A) Peso corporal. B) Masa grasa. C) Masa magra. D) Glucemia. N=6. Diferencias significativas: ** $p < 0,01$ respecto del grupo C al inicio de la dieta; # $p < 0,05$ respecto de grupo C al final de la dieta; \$ $p < 0,05$ respecto de grupo HFD 5 al inicio de la dieta.

Quando la dieta fue administrada durante 15 días, el peso corporal tampoco se modificó ni con el paso del tiempo ni por el tipo de dieta consumida (Figura 30A). En cambio, la masa grasa aumentó con el tiempo y el tipo de dieta. De esta forma, los niveles de masa grasa se incrementaron al finalizar la dieta tanto en los animales control como en los HFD. Además, estos niveles fueron superiores en los animales con HFD respecto a los animales control (Figura 30B). Respecto a la masa magra, el paso del tiempo incrementó los niveles de masa magra aunque este aumento sólo fue significativo en los animales control (Figura 30C). Por último, los niveles de glucosa en sangre no se vieron afectados por la dieta a lo largo del tiempo (Figura 30D).

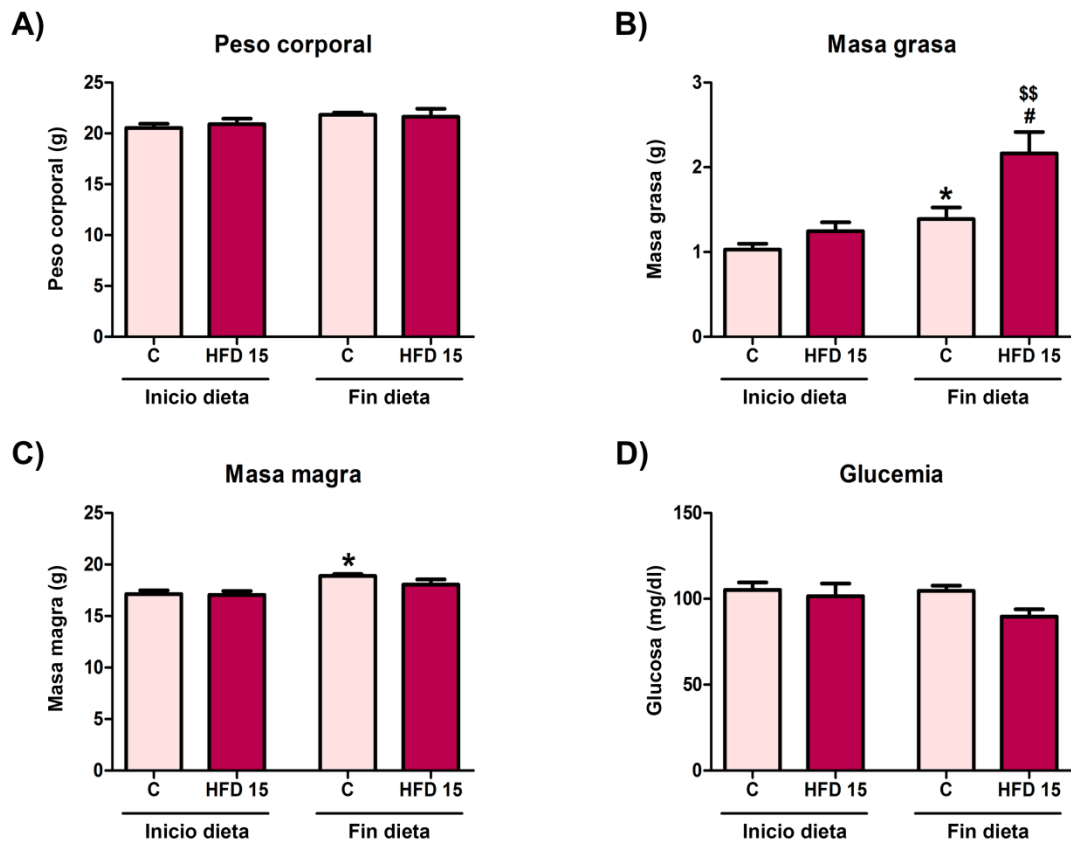


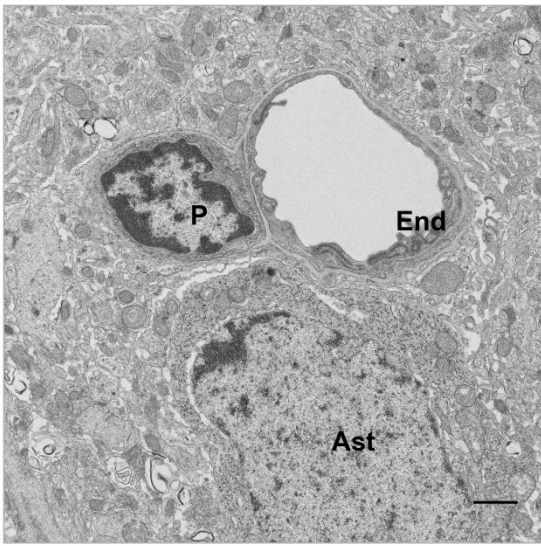
Figura 30. El consumo de HFD durante 15 días incrementa la masa grasa en ratones hembra adultos. Los animales fueron alimentados con dieta control (C) o con HFD (HFD 15) durante 15 días. Los parámetros metabólicos se midieron en ambos grupos experimentales antes de iniciarse la dieta y tras finalizarla. A) Peso corporal. B) Masa grasa. C) Masa magra. D) Glucemia. N=6. Diferencias significativas: * $p < 0,05$ respecto del grupo C al inicio de la dieta; # $p < 0,05$ respecto de grupo C al final de la dieta; \$\$ $p < 0,01$ respecto de grupo HFD 15 al inicio de la dieta.

Por último, se analizó el ciclo estral de las hembras en el día del sacrificio. El estro era la fase predominante en las hembras de todos los grupos experimentales. Así, al menos la mitad de los animales de cada grupo presentaba únicamente células cornificadas en el frotis, lo que caracteriza a esta fase del ciclo estral.

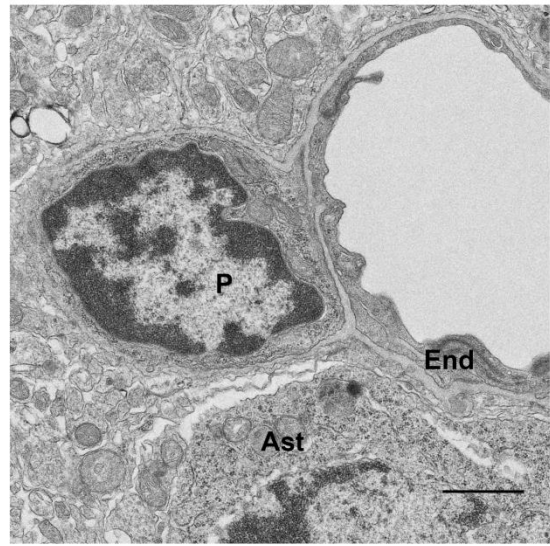
4.2. El consumo agudo de HFD no modifica significativamente la presencia de autofagosomas en el núcleo arcuato

Para analizar el efecto de la HFD en la autofagia del núcleo arcuato, se empleó la técnica de microscopía electrónica de transmisión. Esta técnica permite identificar los autofagosomas mediante su morfología gracias a su rango de resolución en nm (Klionsky *et al.* 2016). Además, implica una ventaja adicional para el análisis en el SNC, pues permite la identificación del tipo celular en el que se encuentran los autofagosomas.

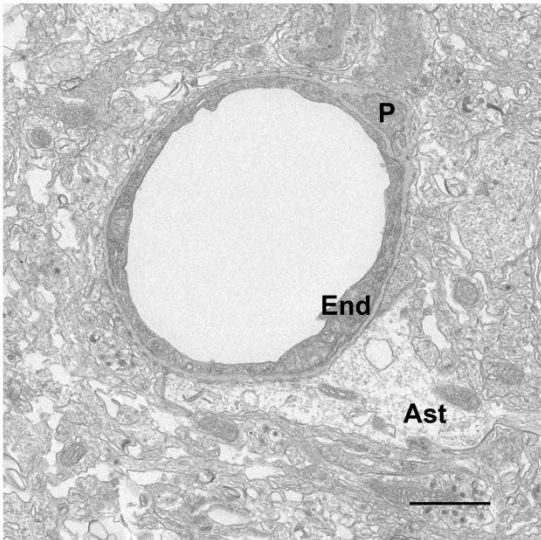
A)



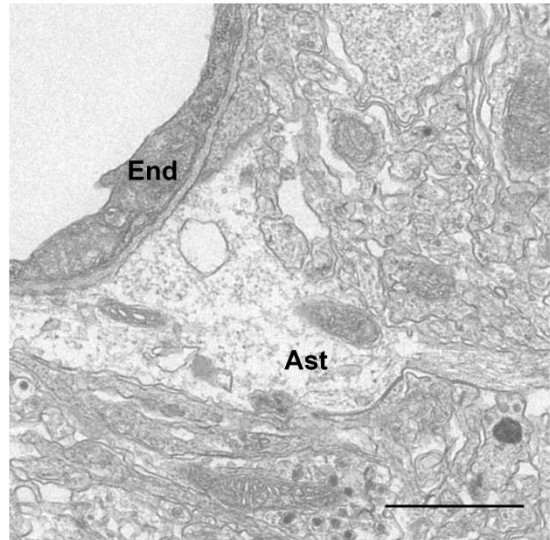
B)



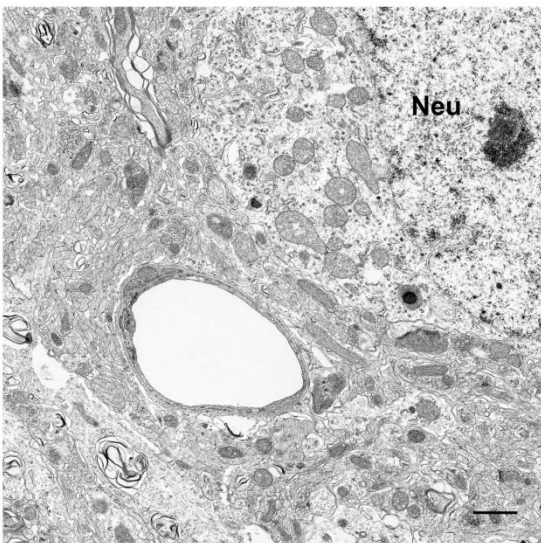
C)



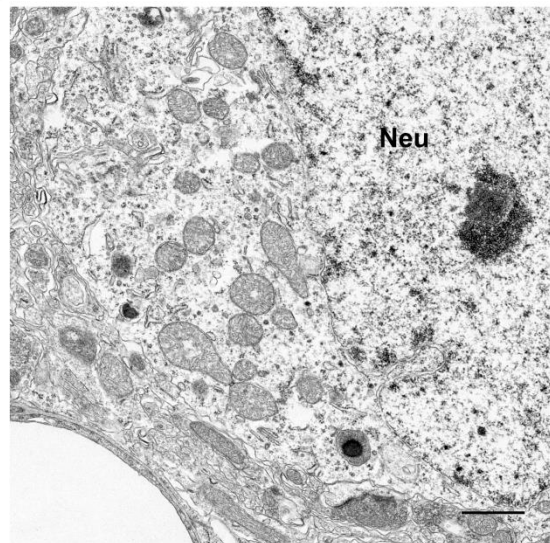
D)



E)



F)



Para caracterizar la autofagia en el núcleo arcuato, se tomaron microfotografías de los capilares sanguíneos de esta región. Como se observa en la Figura 31, los capilares están formados por células endoteliales separadas del tejido adyacente por una lámina basal. Cuando los capilares se encuentran rodeados por pericitos se observan dos láminas basales: la que rodea a la célula endotelial y la que separa al pericito del parénquima. Los pericitos se caracterizan por poseer un núcleo con cromatina condensada alrededor de la membrana nuclear. En torno a los capilares se localizan los astrocitos y sus prolongaciones, que se encuentran en contacto con las neuronas y los capilares. Gracias a la menor condensación de la cromatina alrededor de la membrana nuclear, la presencia del nucléolo y una mayor superficie de citoplasma, las neuronas pueden ser diferenciadas del resto de tipos celulares del cerebro.

Para analizar la autofagia en el arcuato, se identificó la presencia de autofagosomas en el tejido (Figura 32). En primer lugar, se definieron los autofagosomas como vesículas formadas por una doble membrana entre la que existe un espacio de menor densidad electrónica. Hay que tener en cuenta que las mitocondrias son orgánulos de doble membrana que tienen un tamaño similar a los autofagosomas que se forman durante los procesos de autofagia no selectiva (Klionsky *et al.* 2016). Por este motivo, fue muy importante diferenciar ambos tipos de estructuras entre sí. Para ello se tuvo en cuenta que los autofagosomas presentan un mayor espacio entre sus membranas con una diferente densidad electrónica. Además, la matriz mitocondrial posee una estructura organizada en crestas.

Figura 31. Ultraestructura de los capilares sanguíneos del arcuato. Los animales fueron alimentados con dieta control o HFD durante 5 o 15 días, tras lo que se analizó la ultraestructura del arcuato mediante microscopía electrónica de transmisión. El análisis se centró en la periferia de los capilares debido a la riqueza de astrocitos a su alrededor. Se muestran microfotografías representativas de capilares sanguíneos del grupo control (A, C, E) con sus correspondientes ampliaciones (B, D, F). Se indican los diferentes tipos celulares: célula endotelial (End), pericito (P), astrocito (Ast) y neurona (Neu). N=4-6. Barra de escala: 1 μ m.

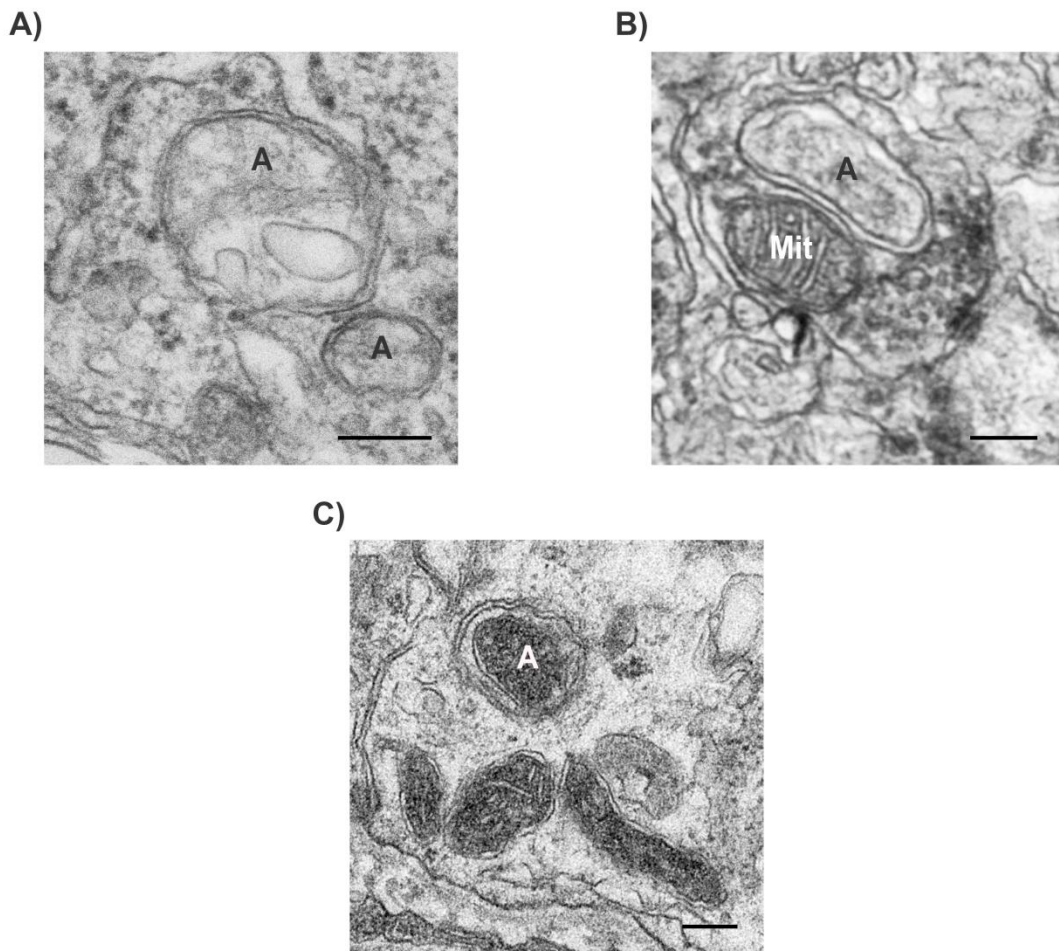


Figura 32. Identificación de los autofagosomas en el núcleo arcuato mediante microscopía electrónica de transmisión. Los animales fueron alimentados con dieta control o HFD durante 5 o 15 días, tras lo que se analizó la presencia de autofagosomas en el arcuato mediante microscopía electrónica de transmisión. Se muestran microfotografías representativas de los autofagosomas correspondientes a los 3 grupos experimentales (control, HFD 5 y HFD 15). A) Ejemplo de autofagosomas, caracterizados por la presencia de una doble membrana y contenido denso en su interior. B) Comparación de un autofagosoma con una mitocondria en una terminal sináptica. C) Ejemplo de mitofagia, en el que se observa una mitocondria envuelta en una vesícula de doble membrana. Se indican los diferentes componentes citoplasmáticos: autofagosoma (A) y mitocondria (Mit). N=4-6. Barra de escala: 200 nm.

Junto con los autofagosomas (doble membrana) también se detectaron estructuras formadas por múltiples membranas concéntricas (Figura 33). Algunos autores han descrito este tipo de estructuras como autofagosomas (Gao *et al.* 2010). Sin embargo, existen dudas acerca de esta identificación, ya que se han asociado con artefactos debidos al proceso de fijación (Kovács *et al.* 2007). Además de dichas estructuras, se encontraron zonas del tejido que presentaban una gran cantidad de membranas desorganizadas muy densas. Estas membranas no poseían una organización en estructuras de doble membrana y el citoplasma de la zona se caracterizaba por tener una baja densidad electrónica. Este tipo de estructuras aparecían en las microfotografías de los tres grupos

experimentales (Figura 34). En algunos casos, estas estructuras también se han identificado como autofagosomas (Son *et al.* 2012). Sin embargo, no fueron tenidas en cuenta para el recuento de los autofagosomas debido a que era difícil localizarlas dentro del citoplasma por la gran complejidad estructural del neuropilo.

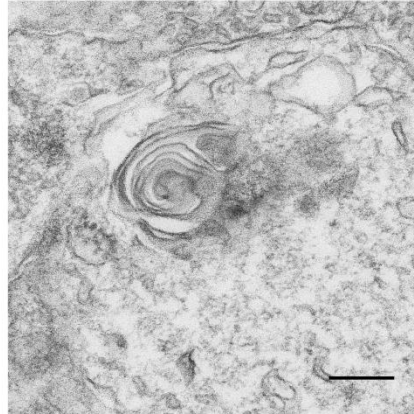
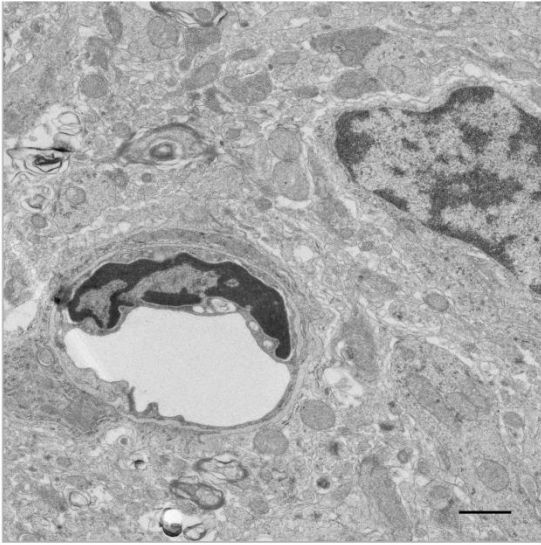


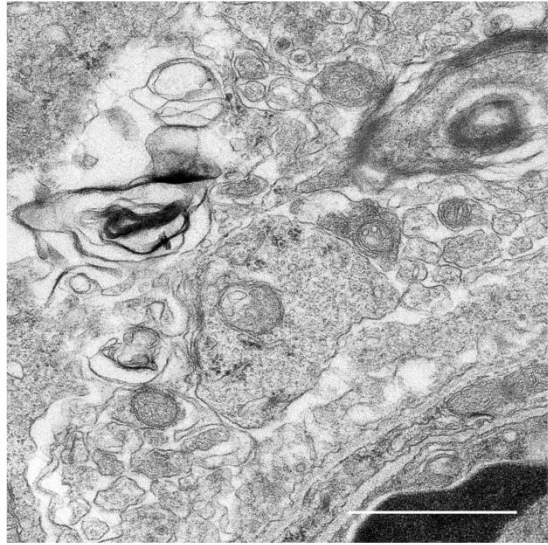
Figura 33. Presencia de estructuras multimembrana en el núcleo arcuato de ratones hembra adultos. Los animales fueron alimentados con dieta control o HFD durante 5 o 15 días, tras lo que se analizó la presencia de autofagosomas en el núcleo arcuato mediante microscopía electrónica de transmisión. Se muestra una microfotografía representativa de las estructuras formadas por múltiples membranas presentes en el núcleo arcuato. Debido a las dudas existentes acerca de si este tipo de estructuras son autofagosomas o no, no se tuvieron en cuenta al realizar el recuento. N=4-6. Barra de escala: 200 nm.

Una vez establecido el criterio para identificar los autofagosomas, se procedió a su recuento. Se identificaron los autofagosomas que aparecían en las microfotografías de cada animal y el número de autofagosomas resultante fue dividido por el área total de tejido analizado en cada animal. Como muestra la Figura 35A, la dieta no modificó el número total de autofagosomas presentes en el núcleo arcuato. A continuación, los autofagosomas fueron divididos en función del tipo celular en el que se localizaban. Debido a la complejidad de la organización del neuropilo, en muchas ocasiones fue difícil determinar si los autofagosomas se encontraban en un astrocito u otro tipo de célula glial. Por este motivo, los autofagosomas identificados se clasificaron en neuronas o glía. El análisis estadístico mostró que la dieta tampoco modificó el número de autofagosomas de ninguno de los dos perfiles celulares de forma significativa (Figuras 35B-35C). Por último, se evaluó si el consumo de HFD modificaba la proporción de autofagosomas localizados en las neuronas respecto a los encontrados en las células gliales. Aunque las diferencias no fueron significativas, el número de autofagosomas detectados en las neuronas respecto a los de la glía parece disminuir con el consumo de HFD (Figura 35D).

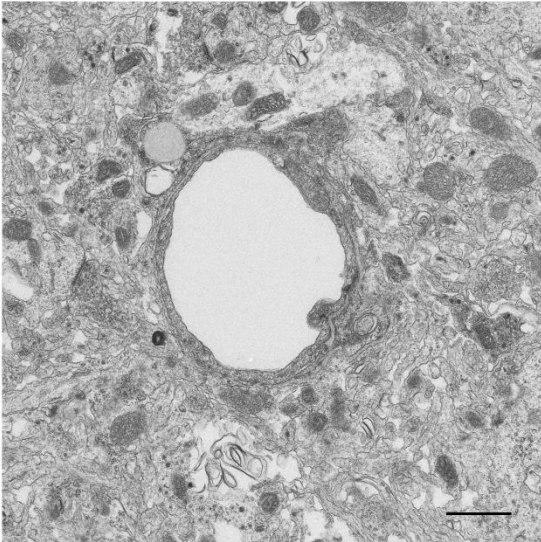
A)



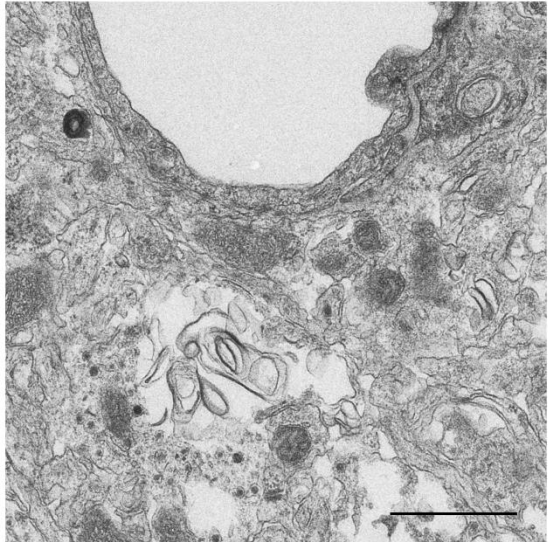
B)



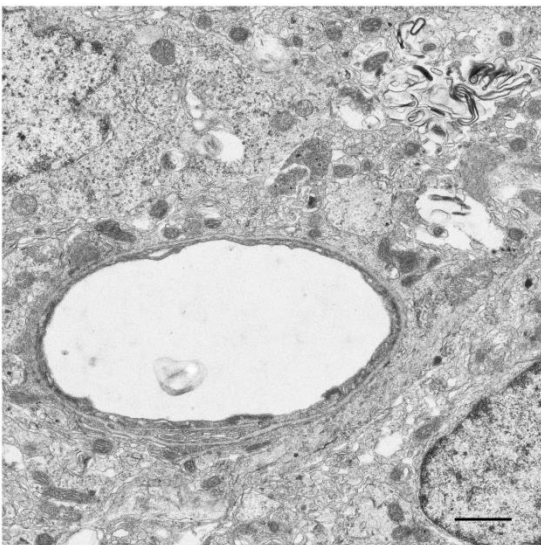
C)



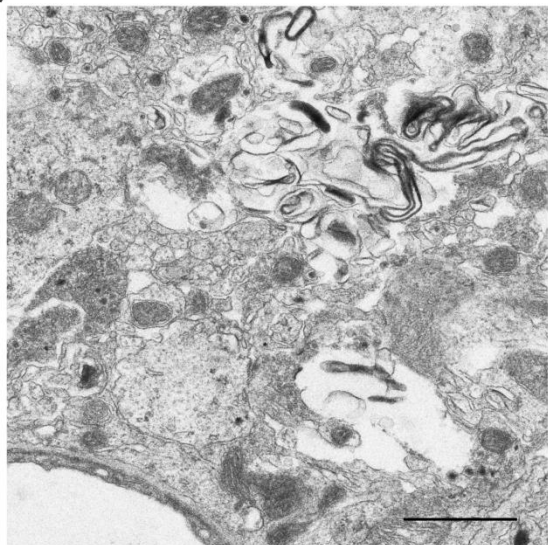
D)



E)



F)



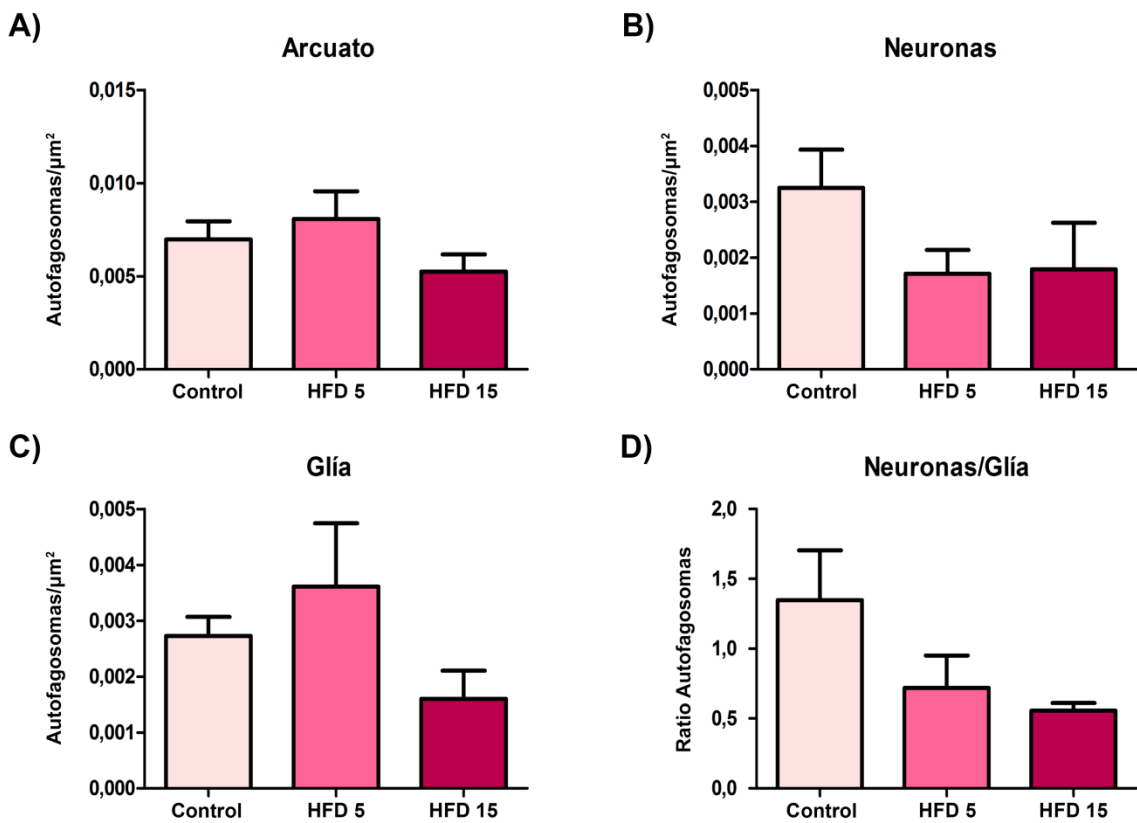


Figura 35. El consumo agudo de HFD tiende a disminuir el número de autofagosomas así como a modificar su localización en el núcleo arcuato de ratones hembra adultos. Los animales fueron alimentados con dieta control o HFD durante 5 o 15 días, tras lo que identificó la presencia de autofagosomas en el núcleo arcuato mediante microscopía electrónica. A) Número de autofagosomas en el área de análisis del núcleo arcuato. B) Número de autofagosomas presentes en las neuronas del área analizada. C) Número de autofagosomas identificados en las células gliales del área estudiada. D) Ratio del número de autofagosomas que se localiza en las neuronas respecto a los que se encuentran en las células gliales. N=3-6. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que el consumo agudo de HFD parece modificar la autofagia del núcleo arcuato en ratones hembra adultos. Además, la respuesta autofágica de las células gliales del arcuato también tiende a alterarse tras este estímulo.

Figura 34. El tejido adyacente a los capilares sanguíneos del núcleo arcuato presenta numerosas membranas desorganizadas y de gran densidad. Los ratones hembra adultos fueron alimentados con dieta control o HFD durante 5 o 15 días, tras lo que se analizó la ultraestructura del arcuato. Debido a la abundancia de astrocitos alrededor de los capilares, se prestó especial atención a esta zona. Se muestran imágenes representativas de los tres grupos experimentales y su correspondiente ampliación: grupo control (A, B), grupo HFD 5 (C, D) y grupo HFD 15 (E, F). En ellas se observan estructuras membranosas desorganizadas en torno a los vasos sanguíneos, independientemente del grupo experimental. N=4-6. Barra de escala: 1 μm .

Discusión

1. Regulación de la autofagia por ayuno prolongado en astrocitos

El ayuno es el mecanismo fisiológico por excelencia para inducir autofagia, tanto en cultivos celulares como en organismos (Mizushima *et al.* 2010). En un principio se observó que el cerebro era un órgano resistente a la autofagia inducida por ayuno en ratones transgénicos GFP-LC3 (Mizushima *et al.* 2004). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que el ayuno activa la autofagia en neuronas de la corteza cerebral y de Purkinje (Alirezai *et al.* 2010), así como en el hipotálamo (Kaushik *et al.* 2011).

La respuesta específica de los astrocitos al ayuno no está tan caracterizada como la de las neuronas. Se ha comprobado que la privación de aminoácidos o la depleción de ATP incrementan los niveles de LC3-II en los astrocitos *in vitro* (Pamenter *et al.* 2012, Simonovitch *et al.* 2016, Moruno-Manchon *et al.* 2018). Además, se ha descrito que los niveles de LC3-II y p62 tienden a disminuir a medida que el ayuno se prolonga de 1 a 4 horas (Simonovitch *et al.* 2016). Sin embargo, se desconocen los efectos del ayuno a largo plazo sobre la autofagia de los astrocitos. Por este motivo, caracterizamos la respuesta de la autofagia en cultivos de astrocitos primarios ayunados entre 4 y 24 horas. Tras 24 horas de ayuno, los niveles de LC3-II y p62 disminuyen en los cultivos de astrocitos. Además, se produce un incremento del flujo de LC3-II respecto al ayuno de corta duración (4 horas). Estos resultados sugieren que la autofagia se mantiene activa durante un ayuno prolongado en los astrocitos.

El efecto del ayuno prolongado se ha caracterizado en otros tipos celulares como fibroblastos embrionarios de ratón o células de cáncer de pulmón (Sahani *et al.* 2014, Allavena *et al.* 2016). Al igual que en nuestro estudio, se observó una disminución de los niveles de LC3-II a medida que el ayuno se prolongaba. Sin embargo, los resultados del flujo de LC3-II son contradictorios respecto a los de nuestro modelo, ya que se produjo una reducción del flujo de LC3-II tanto en los fibroblastos como en las células de cáncer de pulmón. En estos tipos celulares, los niveles de LC3-II disminuían a medida que se prolongaba el ayuno tanto en ausencia como presencia del inhibidor lisosomal. En el caso de los astrocitos, se acumula la misma cantidad de LC3-II en presencia del inhibidor a las 4 horas de ayuno que a las 24 horas, mientras que los niveles de LC3-II sin inhibidor disminuyen tras 24 horas de ayuno. Esto hace que se incremente el flujo de LC3-II en los astrocitos. La discrepancia en estos resultados podría deberse a que los astrocitos presenten una alta eficiencia en el proceso de degradación de autofagosomas, como ya se ha descrito en neuronas *in vitro* (Boland *et al.* 2008). Debido a ello, el ayuno induciría una mayor degradación de los autofagosomas respecto a su formación. Por este motivo, los niveles de LC3-II disminuirían en ausencia del inhibidor lisosomal y el

aumento de la actividad autofágica sólo podría ser detectado al bloquear la fusión de los autofagosomas con los lisosomas.

Respecto a la regulación de p62 por un ayuno prolongado en cultivos de astrocitos, los niveles de proteína disminuyen tras 24 horas de ayuno. La reducción de p62 tras un ayuno prolongado ya ha sido descrito en células cancerígenas de pulmón (Allavena *et al.* 2016) y células tumorales de ovario (Sutton *et al.* 2019). Sin embargo, Sahani, Itakura y Mizushima (2014) describieron que, tras la reducción inicial de los niveles de p62 a causa del ayuno, esta proteína volvía a alcanzar sus niveles basales tras 8 horas de ayuno. La restauración de los niveles de p62 como mecanismo de protección ante el ayuno prolongado se producía en fibroblastos embrionarios de ratón y en una línea celular de hepatocarcinoma humano. Sin embargo, dicho efecto no se observaba en células HeLa o HEK293, donde los niveles de p62 disminuían progresivamente al prolongarse el ayuno. Por tanto, este estudio pone de manifiesto la distinta regulación de la autofagia ante un ayuno prolongado en función del tipo celular.

Junto con la influencia del tipo celular en esta regulación, algunos estudios han puesto de manifiesto que el método de ayuno empleado también puede influir en los resultados obtenidos. Por ejemplo, la restauración de los niveles de p62 tras el ayuno prolongado se produce mediante la privación simultánea de aminoácidos y suero, pero no mediante la privación de aminoácidos o de suero por separado (Sahani *et al.* 2014). Otros estudios, sin embargo, describen una disminución de los niveles de p62 tanto en condiciones de falta de aminoácidos como tras la privación de aminoácidos y suero (Sutton *et al.* 2019). Se ha descrito que la privación de aminoácidos es un estímulo más potente que la privación de suero para inducir autofagia *in vitro* (Mizushima *et al.* 2010). En nuestro modelo experimental se empleó la privación de suero como estímulo para inducir el ayuno, pero se han reproducido algunos de los efectos observados en estudios con privación simultánea de aminoácidos y suero (Allavena *et al.* 2016, Sutton *et al.* 2019). Esto sugiere que la elección del método de inducción de ayuno no tiene tanto peso en la regulación de la autofagia como el tipo celular estudiado.

En la mayoría de los estudios citados anteriormente, se emplearon líneas celulares que procedían de tumores. Las células tumorales presentan una gran plasticidad metabólica, lo que les permite sobrevivir en condiciones de escasez de nutrientes como las presentes en el ambiente tumoral. Uno de los mecanismos que permite la supervivencia de las células tumorales en estas condiciones es la autofagia (Liu y Ryan 2012, Kimmelman y White 2017). Debido a ello, es posible que las células tumorales muestren una respuesta autofágica diferente ante el ayuno. Por este motivo, es interesante analizar los efectos del ayuno en células de cultivos primarios como los astrocitos de

nuestro estudio. Así, aunque se ha visto que el ayuno prolongado activa la autofagia en líneas celulares humanas de glioblastoma (Catalano *et al.* 2015), nuestros resultados confirman dicha activación en los astrocitos primarios.

2. Modulación de la autofagia por estradiol en cultivos de astrocitos

Los resultados de nuestro estudio muestran que el tratamiento con estradiol induce una acumulación de LC3-II y p62 en los cultivos de astrocitos. Este incremento se encuentra asociado a una disminución del flujo de LC3-II, lo que sugiere el bloqueo de la autofagia en los astrocitos de machos y hembras por parte del estradiol.

Diversos estudios *in vitro* muestran que el estradiol inhibe la autofagia en diferentes tipos celulares. El estradiol es capaz de aumentar los niveles de LC3-II y p62, así como disminuir el flujo de LC3-II en células de carcinoma renal (Chen *et al.* 2016) y preadipocitos (Tao *et al.* 2018). Además, el estradiol ejerce sus efectos neuroprotectores en un modelo de toxicidad neuronal por hierro al inhibir la autofagia (Chen *et al.* 2012). El efecto inhibitorio del estradiol en la autofagia también se ha comprobado *in vivo*. Por ejemplo, se ha descrito que el tratamiento con estradiol reduce la actividad autofágica en el útero de hembras ovariectomizadas (Choi *et al.* 2014). Además, disminuye la activación de la autofagia que se genera tras una lesión en la médula espinal, lo que contribuye al efecto neuroprotector del estradiol (Lin *et al.* 2016).

Una de las proteínas principales en la regulación de la autofagia es mTOR, quinasa que actúa como un sensor de la presencia de nutrientes y que controla el crecimiento celular. En presencia de nutrientes, mTOR se encuentra activado y fosforila a ULK1 y ATG13, componentes del complejo de iniciación de la autofagia. Esto hace que el complejo de iniciación se encuentre inactivo y la autofagia esté inhibida (Jung *et al.* 2009). Por tanto, la activación de mTOR está asociada a la inhibición de la autofagia (Singh y Cuervo 2011). En algunos de los estudios anteriores, se describe la activación de mTOR por parte del estradiol como mecanismo de inhibición de la autofagia (Choi *et al.* 2014, Tao *et al.* 2018).

A pesar de estas evidencias, se ha demostrado que el estradiol también induce autofagia en distintos modelos experimentales. En células de la glándula mamaria bovina, el estradiol incrementa el ratio de LC3-II/LC3-I e inhibe a mTOR (Sobolewska *et al.* 2009). Además, el estradiol promueve la autofagia al inhibir la fosforilación de mTOR en osteoblastos. El aumento de la autofagia disminuye la apoptosis de este tipo celular cuando es expuesto a una privación de suero (Yang *et al.* 2013). En estudios *in vivo* también se ha descrito la activación de la autofagia por parte del estradiol. Se ha comprobado que los osteocitos de ratonas ovariectomizadas presentan una acumulación de p62 y

una reducción de los niveles de LC3. Esta reducción de la actividad autofágica, asociada a la apoptosis de los osteocitos, se revierte tras el reemplazo hormonal con estradiol (Florencio-Silva *et al.* 2018).

A partir de estos estudios, se puede concluir que el estradiol es capaz de modular la autofagia, pero que la induce o la inhibe en función del contexto celular. La autofagia es un proceso esencial en el mantenimiento de la homeostasis y la supervivencia celular. Debido al papel tan importante que lleva a cabo en condiciones basales y de estrés celular, su regulación es muy compleja para evitar una deficiencia o un exceso en su activación (Yin *et al.* 2016). En algunos de los modelos experimentales anteriores, se observaron desregulaciones en el proceso de autofagia y el estradiol ejerció parte de sus efectos protectores al modularla. Así, la exposición de las neuronas a un exceso de hierro induce una disminución de su viabilidad (Chen *et al.* 2012). El estradiol es capaz de proteger a las neuronas ante este estímulo lesivo gracias a su poder de inhibición de la autofagia. Sin embargo, la reducción de la masa ósea en ratonas ovariectomizadas se encuentra asociada a una disminución de la autofagia en los osteoblastos. Así, el estradiol es capaz de proteger a los osteoblastos de la apoptosis al aumentar su autofagia (Florencio-Silva *et al.* 2018).

A partir de estos resultados se deduce que no es tan importante si el estradiol induce o bloquea la autofagia, sino que ejerce parte de sus efectos protectores al modularla. El bloqueo de la autofagia en nuestros cultivos de astrocitos podría ser una respuesta protectora ante la privación de suero realizada para tratar a los astrocitos con estradiol. Así, al retirar el FBS del medio se estaría simulando una situación de ayuno que induciría la autofagia en los astrocitos. El estradiol podría intervenir en el mantenimiento de la homeostasis celular bloqueando la autofagia para impedir un exceso de la misma que pudiese dañar a los astrocitos. Sería interesante comprobar si el estradiol puede ejercer su efecto protector mediante la modulación de la autofagia en astrocitos expuestos a un estímulo dañino como el lipopolisacárido (LPS), el cual modifica la autofagia de este tipo celular (Wang *et al.* 2016).

Respecto a la señalización del estradiol en la regulación de la autofagia, hemos comprobado que ninguno de los agonistas específicos de los ER es capaz de modular por sí solo la autofagia en los astrocitos de los machos, lo que sugiere que la acción hormonal necesitaría de la activación en paralelo de más de un tipo de receptor. Sin embargo, en el caso de las hembras, la estimulación específica del ER α o del ER β es suficiente para reproducir algunos de los efectos del estradiol.

El ER α tiene una importante contribución en los efectos del estradiol en la autofagia. Así, el tratamiento con PPT imita la inhibición de la autofagia inducida por el estradiol en preadipocitos (Tao *et al.* 2018). Además, el silenciamiento del ER α impide el efecto del estradiol en la autofagia de neuronas (Chen *et al.* 2012). En otros modelos experimentales, se ha comprobado que la

estimulación del ER β mediante DPN es la responsable de los efectos del estradiol en la autofagia de células renales (Zeng *et al.* 2014) o que puede modular la autofagia para inhibir el crecimiento del linfoma de Hodgkin (Pierdominici *et al.* 2017). Además, se ha descrito el importante papel del GPER en la regulación de la autofagia de cardiomiocitos y células de carcinoma oral (Bai *et al.* 2013, Pei *et al.* 2019). Como puede comprobarse, los diferentes ER pueden contribuir en la modulación de la autofagia señalizada por el estradiol. Puede que las diferencias encontradas entre los estudios se deban a la existencia de una expresión diferencial de los ER en función del tipo celular. Así, el estradiol podría modular la autofagia en función de los niveles de cada tipo de ER. Esto también explicaría las diferencias entre los astrocitos de machos y hembras en respuesta al tratamiento con los agonistas de los ER. Por ejemplo, se ha visto que los astrocitos hipotalámicos de las hembras pueden aumentar los niveles de progesterona en respuesta al estradiol al presentar una mayor cantidad de ER α en la membrana que los machos (Kuo, Hamid, Bondar, Dewing, *et al.* 2010).

3. Efectos del PA en cultivos de astrocitos

En nuestro estudio se ha realizado una amplia caracterización del efecto del PA en los cultivos primarios de astrocitos corticales. Para ello, los astrocitos fueron tratados con las dosis de PA 250 y 500 μ M durante 4,5 y 24 horas. A partir de este modelo experimental, se comprobó que el PA genera un bloqueo en la autofagia que precede a la producción de citoquinas proinflamatorias, la inducción del marcador de estrés de retículo endoplásmico CHOP y la pérdida de viabilidad celular. Además, el tratamiento con PA a corto plazo genera modificaciones en la organización y actividad de los complejos mitocondriales.

De acuerdo con lo demostrado en estudios anteriores, el tratamiento con PA durante 24 horas disminuye la viabilidad de los astrocitos corticales en cultivo (Gupta *et al.* 2012, Wang *et al.* 2012, Wong *et al.* 2014). Junto con la pérdida de viabilidad celular, el PA induce un aumento en la transcripción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6. Dicho incremento está de acuerdo con la producción de citoquinas observada en astrocitos corticales de rata tras el tratamiento con PA 100-400 μ M durante 24 horas (Gupta *et al.* 2012, Liu *et al.* 2013). También se ha observado un incremento en la producción de TNF- α e IL-1 β en astrocitos corticales de ratón empleando una dosis más baja de PA, 50 μ M (Wang *et al.* 2012). Esta respuesta inflamatoria no sólo ha sido detectada en astrocitos corticales, sino también en astrocitos procedentes del hipocampo (Frago *et al.* 2017) o del hipotálamo (Morselli *et al.* 2014). Además, la respuesta inflamatoria también es inducida con tratamientos de PA más cortos, como 8 y 12 horas (Morselli *et al.* 2014, Chen *et al.* 2018). Todos estos resultados demuestran que el PA es un potente estímulo inflamatorio en los astrocitos.

En nuestro modelo experimental, además, analizamos la respuesta inflamatoria en los astrocitos de los machos y de las hembras por separado. La existencia de diferencias sexuales en la respuesta inflamatoria de los astrocitos ha sido descrita previamente en respuesta a estímulos como el LPS (Santos-Galindo *et al.* 2011, Loram *et al.* 2012) y el insecticida dimetoato (DMT) (Astiz *et al.* 2014). En todos estos estudios, los astrocitos de los machos fueron más susceptibles al efecto inflamatorio, siendo su respuesta superior a la de los astrocitos de las hembras. El tratamiento con LPS en astrocitos corticales de ratón indujo un incremento de los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6 superior en los astrocitos de los machos que en los de las hembras (Santos-Galindo *et al.* 2011). Un efecto similar se observó en astrocitos corticales de rata en respuesta al LPS, en los que se produjo un incremento de la expresión de IL-1 β superior en los astrocitos de los machos que en los de las hembras (Loram *et al.* 2012). En el caso del DMT, este sólo incrementó la transcripción de las citoquinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 en los astrocitos de los machos (Astiz *et al.* 2014). Junto con las diferencias sexuales detectadas en respuesta al LPS y al DMT, también se ha descrito una mayor respuesta inflamatoria de los astrocitos de los machos al PA (Morselli *et al.* 2014). Así, el PA indujo un incremento de la transcripción de IL-6 e IL-1 β superior en los astrocitos de los machos que en los de las hembras. Los resultados de nuestro estudio demuestran que el tratamiento con PA 500 μ M durante 24 horas induce un incremento significativo de los niveles de TNF- α e IL-1 β únicamente en los astrocitos de los machos. Estos resultados confirman la existencia de diferencias sexuales en respuesta al PA en los astrocitos corticales, demostrando que no sólo están presentes en astrocitos hipotalámicos.

Junto con la respuesta inflamatoria, el PA disminuye la expresión del ER α en los astrocitos hipotalámicos de los machos (Morselli *et al.* 2014). Esta disminución podría contribuir a la mayor susceptibilidad de los astrocitos de los machos a la inflamación. Además, estos autores demuestran que es necesaria la presencia del ER α para que el estradiol ejerza sus efectos protectores en dicho modelo experimental. Debido a las diferencias sexuales en la respuesta inflamatoria encontradas en nuestro estudio, también decidimos evaluar si la expresión de los ER se veía afectada por el PA. Además, no sólo analizamos la expresión del ER α , sino también la del ER β y GPER ya que el estradiol media sus efectos protectores en los astrocitos a través de los tres ER (Acaz-Fonseca *et al.* 2014). De acuerdo con lo descrito previamente, el tratamiento con PA disminuye la expresión del ER α en los astrocitos corticales. Sin embargo, esta disminución se produce en los astrocitos de las hembras y no en los de los machos, a diferencia de lo observado en los astrocitos hipotalámicos (Morselli *et al.* 2014). Además, la reducción del ER α se encuentra acompañada de la disminución simultánea del ER β y GPER sólo en los astrocitos de las hembras. Estos resultados consolidan el hecho de que el tratamiento con PA modifica la expresión de los ER y lo hace de forma diferente entre los astrocitos

de los machos y de las hembras. Sin embargo, esta respuesta sexodimórfica difiere entre los astrocitos hipotalámicos y corticales.

Las implicaciones de estas diferencias sexuales en función del área del cerebro estudiada no han sido exploradas, pero podrían contribuir a las respuestas sexodimórficas existentes ante el consumo de HFD o de enfermedades neurodegenerativas (en las que están implicadas partes diferentes del cerebro). En el hipotálamo, la reducción de los niveles de ER α en los astrocitos de los machos podría contribuir a la mayor respuesta inflamatoria de los machos tras el consumo de una HFD (Morselli *et al.* 2014). En el caso de la corteza, el tratamiento con PA genera alteraciones fisiopatológicas propias de la enfermedad de Alzheimer en neuronas corticales mediadas por los astrocitos (Patil *et al.* 2007, Liu *et al.* 2013). Además, los niveles de PA se incrementan tras una lesión isquémica (Pilitsis *et al.* 2002) y en la corteza parietal de enfermos de Alzheimer (Fraser *et al.* 2010). La existencia de diferencias sexuales en la respuesta de los astrocitos corticales al PA sugiere que los astrocitos de esta región también pueden contribuir a la generación de diferencias sexuales en diversas enfermedades neurológicas.

Debido a la regulación de la expresión de los ER por parte del PA y los conocidos efectos antiinflamatorios del estradiol en los astrocitos (Acaz-Fonseca *et al.* 2014, Morselli *et al.* 2014), se evaluó el posible efecto protector del estradiol ante la pérdida de viabilidad inducida por el PA. En nuestro modelo experimental, el tratamiento con estradiol no consigue revertir la disminución de la viabilidad celular, como también se ha visto en astrocitos hipocampales (Frago *et al.* 2017). Debido a que la estimulación específica de los ER puede inducir efectos opuestos (Lewis *et al.* 2008, Grassi *et al.* 2013), los astrocitos fueron tratados con agonistas específicos del ER α , ER β y GPER. A pesar de que se han descrito efectos protectores del estradiol mediados específicamente por ER α y ER β en astrocitos (Lewis *et al.* 2008, De Marinis *et al.* 2013, Spence *et al.* 2013), la estimulación específica de los diferentes ER no protege a los astrocitos del efecto letal del PA. Estos resultados contradicen lo descrito por González-Giraldo *et al.* (2019), que afirman que tanto el tratamiento con PPT como con DPN protege a los astrocitos del efecto deletéreo del PA. Estas diferencias podrían deberse al empleo de un modelo experimental distinto (línea celular de astrocitoma humano). Además de caracterizar el efecto de los agonistas, estudiamos el papel del estradiol endógeno de los astrocitos ante el tratamiento con PA. Los astrocitos en cultivo son capaces de aumentar la expresión de aromatasa en condiciones estresantes para favorecer la producción de estradiol endógeno y fomentar así su protección (Azcoitia *et al.* 2003). Mediante el empleo de letrozol (inhibidor de la enzima aromatasa), comprobamos que la síntesis local de estradiol tampoco protege a los astrocitos del efecto del PA. Todos estos resultados ponen de manifiesto que la gran toxicidad inducida por el PA no puede ser evitada mediante el tratamiento con compuestos estrogénicos, a pesar de los conocidos efectos

antiinflamatorios de estos compuestos. Esto sugiere que otros mecanismos, aparte de la inflamación, median los efectos tóxicos del PA.

Entre los mecanismos alternativos que generan daño en los astrocitos tratados con PA se encuentra la disfunción mitocondrial. Diversos estudios han demostrado que el tratamiento con PA aumenta la producción de ROS y disminuye el potencial de membrana mitocondrial (Wong *et al.* 2014, González-Giraldo *et al.* 2018). Estas alteraciones no sólo han sido descritas en astrocitos, sino también en otros tipos celulares como los podocitos (Liu, Chen, *et al.* 2018), las células hepáticas (Lou *et al.* 2014) o los cardiomiocitos (Marín-Royo *et al.* 2018). Además, el tratamiento con PA también induce una depleción de los niveles de ATP celular (Park *et al.* 2014, García-Ruiz *et al.* 2015). Cuando se analizan los efectos del PA en la estructura mitocondrial, se ha comprobado que disminuye los niveles de cardiolipina en células como astrocitos y cardiomiocitos (Ostrander *et al.* 2001, González-Giraldo *et al.* 2018, Marín-Royo *et al.* 2018). La cardiolipina es un fosfolípido presente en la membrana mitocondrial interna que juega un papel fundamental en la función mitocondrial. Su disminución contribuye a inducir muerte celular mediante la liberación del citocromo c (Ostrander *et al.* 2001) o la síntesis de ceramidas (El Bawab *et al.* 2001), lo que está asociado a una mayor muerte celular. Junto con la alteración en los niveles de cardiolipina, el tratamiento con PA disminuye los niveles de todos los complejos mitocondriales así como su actividad en hepatocitos (García-Ruiz *et al.* 2015).

Estos resultados ponen de manifiesto que el PA altera la función mitocondrial al modificar, entre otros aspectos, su estructura. Sin embargo, se desconoce el efecto del PA sobre la organización de los complejos mitocondriales en supercomplejos, los cuales desempeñan importantes funciones en la mitocondria (Genova y Lenaz 2014). La reducción de los niveles de cardiolipina tras el tratamiento con PA podría ser una señal de que los supercomplejos mitocondriales están alterados, ya que la cardiolipina interviene en la estabilización de los supercomplejos de levaduras y mamíferos (Pfeiffer *et al.* 2003, McKenzie *et al.* 2006). Por este motivo, decidimos analizar si el PA modificaba los supercomplejos mitocondriales de los astrocitos.

El tratamiento con PA aumenta la proporción y la actividad del complejo I libre respecto al que se encuentra asociado a los supercomplejos. El complejo I, junto con el complejo III, es el principal sitio de producción de ROS en la mitocondria (Murphy 2008). Debido a ello, la presencia de mayor proporción de complejo I libre podría estar asociada a una mayor producción de ROS, como se ha descrito previamente en cultivos de astrocitos (Lopez-Fabuel *et al.* 2016). Esta modificación de la organización del complejo I podría contribuir al incremento de ROS descrito tras el tratamiento con PA en astrocitos (Wong *et al.* 2014, González-Giraldo *et al.* 2018).

Junto con el incremento de la producción de ROS, la disminución del complejo I que se encuentra asociado a los supercomplejos podría reducir la eficiencia de la respiración mitocondrial. Sin embargo, se ha descrito que la organización de los supercomplejos se modifica para permitir que la respiración mitocondrial se adapte a los sustratos presentes en la célula (Lapuente-Brun *et al.* 2013). Por tanto, los supercomplejos mitocondriales de los astrocitos podrían modificarse para adaptarse al exceso de PA. El PA, como el resto de ácidos grasos, se degrada mediante β -oxidación, un proceso que genera mayor proporción de $\text{FADH}_2/\text{NADH}$ que la oxidación de la glucosa. En la primera reacción del proceso de β -oxidación se genera FADH_2 , cuyos electrones son cedidos a la flavoproteína transportadora de electrones (ETF, del inglés *electron transfer flavoprotein*). Gracias a la acción de la enzima ETF:ubiquinona oxidorreductasa, la ETF puede ceder sus electrones a la ubiquinona, que los transporta hasta el complejo III de la cadena transportadora de electrones (Nsiah-Sefaa y McKenzie 2016). Además, a partir de la β -oxidación de los ácidos grasos se obtiene acetil-CoA, que participa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. En este proceso se obtiene FADH_2 , cuyos electrones entran en la cadena respiratoria a través del complejo II (Sharpe y McKenzie 2018). El tratamiento con PA en los astrocitos genera un incremento de los niveles del complejo II, lo que podría suponer un mecanismo compensatorio para favorecer la respiración mitocondrial desde este complejo. Además, el PA reduce la proporción de complejo IV libre respecto al asociado al complejo III. Esta modificación sugiere un mayor acoplamiento entre el complejo III y IV tras el tratamiento con PA, lo que favorecería el transporte electrónico entre ambos complejos. De esta forma, el incremento de los niveles del complejo II junto con el mayor acoplamiento entre el complejo III y IV favorecerían la respiración mitocondrial a partir del FADH_2 formado en la β -oxidación. Esta respuesta podría ser un mecanismo que permita optimizar la respiración mitocondrial ante la presencia de PA. Para comprobar esta hipótesis, sería necesario realizar un estudio detallado de la respiración mitocondrial en los astrocitos tratados con PA.

La organización de la ATP sintasa también se ve afectada por el tratamiento con PA. La ATP sintasa se organiza en dímeros y oligómeros. Aunque los monómeros de esta enzima son capaces de sintetizar ATP por sí mismos, su dimerización y oligomerización favorecen su estabilidad y la producción de ATP. Además, la presencia de estas estructuras contribuye a la formación de las crestas mitocondriales (Jonckheere *et al.* 2012). El tratamiento con PA reduce la proporción del complejo F_1 de la ATP sintasa que se encuentra libre respecto al presente en oligómeros, así como su actividad en los astrocitos. Esto podría indicar que el tratamiento con PA favorece la oligomerización de la ATP sintasa, aumentando la estabilidad de las crestas mitocondriales. Aunque se ha descrito la disminución de la expresión y actividad la enzima en hepatocitos tratados con PA (García-Ruiz *et al.* 2015), se desconoce el efecto que el PA puede tener sobre su organización. Nuestros resultados

sugieren que el PA podría promover la organización de la ATP sintasa en oligómeros, contribuyendo así a la estabilidad de las crestas mitocondriales. Este cambio podría ser una respuesta compensatoria ante el daño mitocondrial generado por el PA, que impide la correcta función mitocondrial y acaba disminuyendo la producción de ATP.

Se han descrito numerosas diferencias sexuales en la función mitocondrial. Muchas de estas diferencias están asociadas a la producción de energía y el estrés oxidativo, lo que genera diferencias sexuales en enfermedades en las que la mitocondria tiene un papel fundamental (Demarest y McCarthy 2015, Ventura-Clapier *et al.* 2017). En el cerebro, las mitocondrias de las hembras presentan una mayor actividad de la cadena transportadora de electrones y una mayor producción de ATP (Guevara *et al.* 2011, Escames *et al.* 2013). Además, las mitocondrias de las hembras presentan menor estrés oxidativo (Borrás *et al.* 2003, Gaignard *et al.* 2015). A pesar de la existencia de las diferencias sexuales en la función mitocondrial, estas no han sido exploradas en los supercomplejos mitocondriales.

A partir del análisis de la organización mitocondrial en los cultivos de astrocitos, detectamos la existencia de diferencias sexuales en dicha organización. Así, los astrocitos de las hembras muestran niveles superiores y una mayor actividad del complejo I libre. Como ya se explicó anteriormente, el incremento de los niveles de complejo I libre puede relacionarse con una mayor producción de ROS en los astrocitos (Lopez-Fabuel *et al.* 2016). Este resultado contrasta con la menor producción de ROS descrita en las mitocondrias del cerebro en hembras (Borrás *et al.* 2003, Gaignard *et al.* 2015). Sin embargo, la presencia de mayores niveles de ROS en los astrocitos de las hembras podría estar asociada a una mayor activación de sus sistemas antioxidantes, lo que les conferiría una mayor protección ante el estrés oxidativo. Se ha descrito que el factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2, del inglés *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), un factor de transcripción indispensable en la defensa antioxidante de astrocitos, se regula por la presencia de ROS en este tipo celular (Vicente-Gutierrez *et al.* 2019). Debido a ello, sería interesante medir la producción de ROS y la expresión de las enzimas detoxificantes en los astrocitos de machos y hembras. Junto con la diferencia en los niveles del complejo I libre, los astrocitos de las hembras muestran más cantidad de complejo II. Previamente se ha descrito una mayor actividad del complejo II en las mitocondrias del cerebro de mujeres respecto al de hombres (Harish *et al.* 2013). Por último, se detectó un efecto estadístico del sexo en los niveles de actividad de la ATP sintasa libre. En general, las hembras presentan menores niveles de actividad de la ATP sintasa libre, lo que podría estar asociado a una mayor actividad de esta enzima oligomerizada. Este aspecto podría facilitar la producción de ATP en las hembras y explicaría la mayor síntesis de ATP observada en las mitocondrias cerebrales de este sexo (Guevara *et al.* 2011, Escames *et al.* 2013).

Junto con el estudio de las alteraciones mitocondriales tras el tratamiento con PA, analizamos el mecanismo de autofagia debido a su importante papel en la viabilidad celular. Además, la autofagia interviene en el metabolismo de los lípidos, promoviendo la obtención de ácidos grasos libres a partir de las gotas lipídicas en condiciones fisiológicas (Singh *et al.* 2009, Singh y Cuervo 2012). Sin embargo, ante la presencia de un exceso de ácidos grasos como el PA, la autofagia se inhibe en diversos tipos celulares como los hepatocitos (Mei *et al.* 2011, González-Rodríguez *et al.* 2014) o las células β -pancreáticas (Las *et al.* 2011, Mir *et al.* 2015, Trudeau *et al.* 2016). Entre las causas del bloqueo de la autofagia por el PA se encuentra un defecto en la fusión entre los autofagosomas y lisosomas asociado a cambios en la composición lipídica de sus membranas (Koga *et al.* 2010). Además, el tratamiento con PA altera la acidificación de los lisosomas, impidiendo la fusión de los autofagosomas con los lisosomas (Las *et al.* 2011, Trudeau *et al.* 2016). Junto con estos cambios, el PA induce estrés de retículo endoplásmico, al acumularse en este orgánulo (Akoumi *et al.* 2017). Como la autofagia inhibe la respuesta del estrés de retículo (Jung *et al.* 2015), su bloqueo por parte del PA puede favorecer el estrés de retículo endoplásmico y causar muerte celular en hepatocitos y células β -pancreáticas (González-Rodríguez *et al.* 2014, Mir *et al.* 2015).

Los estudios anteriores muestran que la autofagia es un mecanismo participante en la muerte celular inducida por el PA. Debido a ello, comprobamos si el tratamiento con PA inducía cambios en la autofagia de los astrocitos. El PA incrementa los niveles de LC3-II y p62 en los astrocitos. Al inhibir la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, el tratamiento con PA disminuye el flujo de LC3-II. Estos resultados demuestran la existencia de un bloqueo de la autofagia en los cultivos de astrocitos debido al tratamiento con PA. A pesar de que estos resultados concuerdan con el bloqueo de la autofagia descrito en distintos tipos celulares, recientemente se ha descrito que el PA induce autofagia en cultivos de astrocitos (Chen *et al.* 2018). En este estudio, se describe un incremento de los niveles de LC3-II tras el tratamiento con PA junto con una acumulación de autofagosomas en los astrocitos. Aunque no se cuantificó el flujo de LC3-II ni se midieron los niveles de sustratos de autofagia como p62, la inhibición de la formación de autofagosomas mediante 3-metiladenina impidió los cambios de autofagia generados por el PA. Estos resultados sugieren que el PA activa la autofagia en astrocitos hipocámpales, en contraposición al bloqueo de la autofagia detectado en nuestro modelo experimental. Estas diferencias podrían deberse a que los astrocitos de ambos estudios proceden de regiones diferentes. Por ejemplo, se han detectado diferencias en la respuesta al PA en astrocitos hipotalámicos y corticales (Oliveira *et al.* 2018).

El bloqueo de la autofagia detectado en nuestro modelo experimental se produce también tras un tratamiento corto con PA (4,5 horas). Sin embargo, el PA modula de manera diferente la transcripción de los genes que codifican las proteínas LC3 y p62 (Map1lc3b y Sqstm1,

respectivamente) en función de la duración del tratamiento con PA. Mientras que el tratamiento corto con PA no modifica la transcripción de *Map1lc3b* ni *Sqstm1*, el tratamiento prolongado disminuye la transcripción de *Map1lc3b* y aumenta la de *Sqstm1*. La regulación de la transcripción de estos genes a medida que se prolonga el tratamiento con PA ha sido descrita previamente en células hipotalámicas (Hernández-Cáceres *et al.* 2019). Además, el incremento del ARNm de *Sqstm1* ha sido identificado como un mecanismo inductor de autofagia en situaciones de estrés celular (Song *et al.* 2017). Sin embargo, la regulación transcripcional de las proteínas implicadas en la autofagia no está demasiado estudiada a nivel experimental, por lo que no se recomienda emplearla como método de referencia para analizar la autofagia (Mizushima *et al.* 2010, Klionsky *et al.* 2016).

El tratamiento corto con PA también induce un bloqueo de la autofagia, sin afectar la transcripción de las citoquinas proinflamatorias ni la viabilidad celular a diferencia de lo que ocurría tras el tratamiento prolongado con PA. Estos resultados muestran que el bloqueo de la autofagia precede a otras alteraciones inducidas por el PA como son la inflamación o la muerte celular. Para determinar si el bloqueo de la autofagia era responsable de estos cambios, se indujo la autofagia mediante rapamicina en los astrocitos. Sin embargo, el tratamiento con rapamicina no revierte el incremento de IL-6 ni la pérdida de viabilidad inducida por el PA. Además, el bloqueo de la autofagia mediante HCQ no reduce la viabilidad celular de los astrocitos por sí mismo aunque incrementa la letalidad del PA tras 24 horas de tratamiento. De esta forma, el efecto letal del PA sólo se observa tras un tratamiento prolongado, que está asociado a otras alteraciones como el incremento de la inflamación o la inducción de CHOP. Estos resultados concuerdan con lo observado en otros tipos celulares, en los que el PA, además de generar un bloqueo de la autofagia, induce otras alteraciones como el estrés de retículo endoplásmico (González-Rodríguez *et al.* 2014, Mir *et al.* 2015).

A partir de estos resultados podemos concluir que el tratamiento con PA sólo induce la muerte de los astrocitos cuando, además de bloquear la autofagia, genera inflamación o estrés de retículo endoplásmico. Estos cambios, en su conjunto, pueden alterar profundamente la homeostasis celular e inducir la muerte celular en los astrocitos.

4. Modulación de la autofagia hipotalámica en un modelo de consumo agudo de HFD

Al igual que se ha descrito la alteración de la autofagia tras el tratamiento con PA en modelos *in vitro*, la administración de HFD modifica la autofagia en órganos como el hígado (Singh *et al.* 2009, González-Rodríguez *et al.* 2014), páncreas (Chu *et al.* 2015) o corazón (Xu *et al.* 2013). Además, diversos estudios describen que la administración crónica de HFD disminuye la autofagia en el

hipotálamo (Meng y Cai 2011, Ignacio-Souza *et al.* 2014, Portovedo *et al.* 2015). Sin embargo, son escasos los estudios sobre el efecto del consumo agudo de HFD en la autofagia. Por ejemplo, se ha descrito que la administración de HFD durante 24 horas activa la autofagia en el corazón, protegiendo a los cardiomiocitos de la apoptosis tras una lesión isquémica (Haar *et al.* 2014). Además, el consumo de HFD durante 2 semanas induce autofagia en el hígado y el tejido adiposo (Papáčková *et al.* 2012, Hansson *et al.* 2018). Sin embargo, la autofagia se bloquea cuando la HFD se prolonga durante 10 semanas en el hígado (Papáčková *et al.* 2012).

Estos estudios demuestran que la autofagia se modula no sólo tras un consumo prolongado de HFD, sino tras un tiempo muy corto de exposición a este tipo de dieta. Además, su regulación por HFD a corto plazo tiene importantes consecuencias en el organismo. Por tanto, decidimos estudiar el efecto que tenía el consumo agudo de HFD (5 y 15 días) en la autofagia del hipotálamo, donde se desconocen los efectos de este tipo de consumo.

En primer lugar, se caracterizó la respuesta metabólica en nuestro modelo experimental. Se ha demostrado que la administración de HFD, aunque sea durante un período corto de tiempo, es capaz de modificar parámetros metabólicos en los animales. Diversos estudios ponen de manifiesto que el consumo de HFD durante un período variable entre 3 días y 2 semanas incrementa el peso corporal o su ganancia en ratones (Thaler *et al.* 2012, Voigt *et al.* 2013, Williams *et al.* 2014, Hansson *et al.* 2018). Estos cambios se encuentran asociados a un aumento de la masa grasa entre el día 3 y 7 de consumo de HFD (Thaler *et al.* 2012, Williams *et al.* 2014). El consumo agudo de HFD también modifica la glucemia, ya que se ha comprobado que los niveles de glucosa en sangre incrementan a partir de 2 días de HFD (Hansson *et al.* 2018) y que se produce una alteración de la tolerancia a la glucosa tras 3 días de HFD (Williams *et al.* 2014).

A diferencia de los resultados anteriores, los parámetros metabólicos apenas se modifican en nuestro modelo experimental. El peso corporal de los animales no se incrementa tras el consumo de HFD durante 5 o 15 días respecto al control. Además, la masa grasa sólo aumenta significativamente tras el consumo de HFD durante 15 días. La masa magra no se modifica en los animales HFD, a pesar de incrementar en el grupo control con el paso del tiempo. Por último, la HFD no modula la glucemia de los animales, aunque se observa una disminución de los niveles de glucosa tras el consumo de HFD durante 5 días. Sin embargo, esta reducción se encuentra dentro del rango fisiológico de los niveles de glucosa en las hembras (Macotela *et al.* 2009).

Esta falta de respuesta a la HFD en los parámetros metabólicos puede deberse a que nuestro estudio se realizó en hembras, a diferencia de los estudios mencionados anteriormente. Se ha descrito que los machos son más susceptibles que las hembras a sufrir alteraciones metabólicas tras

el consumo crónico de HFD (Pettersson *et al.* 2012, Morselli *et al.* 2014, Dorfman *et al.* 2017). Sin embargo, la existencia de diferencias sexuales no ha sido tan explorada tras un consumo de HFD agudo. A pesar de ello, se ha descrito que el consumo de HFD durante una semana incrementa la glucemia en machos, pero no en hembras peripuberales (Freire-Regatillo *et al.* 2019). En este estudio, las hembras tampoco modificaron su peso tras la HFD, como ocurre en nuestro modelo. Sin embargo, este dato difiere de lo publicado por Venancio *et al.* (2017), quienes demostraron un incremento del peso corporal tras una semana de HFD después el destete. Una diferencia principal entre ambos estudios es la edad de los animales, que también es distinta a la de los animales empleados en nuestro trabajo (hembras adultas). Por tanto, se requieren más estudios para explorar la existencia de diferencias sexuales metabólicas tras la administración aguda de HFD.

La falta de alteraciones metabólicas importantes en nuestro modelo experimental permite estudiar de manera más directa el efecto que tiene el exceso de lípidos en la regulación de la autofagia hipotalámica *in vivo*. A partir del análisis realizado, se observó que el número de autofagosomas identificados en el área analizada del núcleo arcuato es escaso. Además, dicho número tiende a disminuir en los animales que consumieron HFD durante 15 días. Esta tendencia existe tanto en los autofagosomas presentes en las neuronas como en la glía. Además, parece que la HFD modifica la proporción de autofagosomas presentes en neuronas respecto a los de las células gliales. De esta forma, dicha proporción tiende a disminuir en los animales HFD. La falta de diferencias significativas puede explicarse por el reducido número de muestras, especialmente en el grupo HFD 15 ($n=3-4$), y el escaso número de autofagosomas detectado en cada animal. Debido a ello, sería conveniente aumentar el número de animales del estudio para tener una muestra más representativa. Además, sería interesante inhibir la función lisosomal *in vivo* antes del sacrificio como ya se ha hecho en estudios de consumo agudo de HFD (Papáčkova *et al.* 2012, Haar *et al.* 2014). Esta aproximación facilitaría el recuento de los autofagosomas, ya que al inhibir su degradación se produce su acumulación. Además, permitiría analizar si existen cambios en el flujo de autofagosomas tras la HFD, como hacemos en nuestro modelo *in vitro*. Gracias a ello se podría discernir si los cambios en el número de autofagosomas están asociados a diferencias en su formación o degradación.

El cerebro presenta una enorme heterogeneidad celular a diferencia de otros órganos como el hígado o el corazón. Por tanto, es muy interesante emplear técnicas de análisis que permitan diferenciar los cambios en autofagia en los distintos tipos celulares. La microscopía electrónica es una de las técnicas que permiten la identificación celular, por lo que fue el método elegido para realizar este análisis. Además, permite detectar los autofagosomas mediante su característica estructura. Sin embargo, la cuantificación de los autofagosomas mediante esta técnica es de gran complejidad

debido a la necesidad de un apropiado análisis morfométrico (Klionsky *et al.* 2016). Por estos motivos, sería interesante confirmar la existencia de cambios en la autofagia mediante otras técnicas en nuestro modelo experimental. Una opción sería analizar la expresión de proteínas que intervienen en la autofagia como LC3 o p62 mediante inmunofluorescencia. Esta técnica también permite la identificación del tipo celular, algo esencial debido a nuestro interés por determinar el papel de los astrocitos en la regulación de la autofagia.

Conclusiones

1. El ayuno prolongado activa la autofagia en astrocitos, mientras que el tratamiento con estradiol la disminuye.
2. El PA bloquea la autofagia de los astrocitos.
3. La pérdida de viabilidad inducida por el PA en los astrocitos se produce sólo cuando el bloqueo de la autofagia está acompañado de otras alteraciones como la inflamación o el estrés de retículo endoplásmico.
4. El PA modifica la organización de los complejos mitocondriales en supercomplejos y su actividad en los astrocitos.
5. Existen diferencias sexuales en la organización y la actividad de los complejos mitocondriales en los astrocitos.
6. El consumo agudo de HFD podría modular la autofagia en el núcleo arcuato de animales adultos, tanto en las neuronas como en las células gliales.

Bibliografía

- Abounit, K., Scarabelli, T.M., y McCauley, R.B., 2012. Autophagy in mammalian cells. *World Journal of Biological Chemistry*, 3 (1), 1.
- Acáz-Fonseca, E., Ortiz-Rodríguez, A., López-Rodríguez, A.B., García-Segura, L.M., y Astiz, M., 2017. Developmental sex differences in the metabolism of cardiolipin in mouse cerebral cortex mitochondria. *Scientific Reports*, 7, 43878.
- Acáz-Fonseca, E., Sánchez-González, R., Azcoitia, I., Arevalo, M.A., y García-Segura, L.M., 2014. Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17 β -estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 389 (1-2), 48-57.
- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M.L., Pérez-Martos, A., y Enriquez, J.A., 2008. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular Cell*, 32 (4), 529-539.
- Akoumi, A., Haffar, T., Moustjerji, M., Kiss, R.S., y Bousette, N., 2017. Palmitate mediated diacylglycerol accumulation causes endoplasmic reticulum stress, Plin2 degradation, and cell death in H9C2 cardiomyoblasts. *Experimental Cell Research*, 354 (2), 85-94.
- Alirezai, M., Kemball, C.C., Flynn, C.T., Wood, M.R., Whitton, J.L., y Kiosses, W.B., 2010. Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy*, 6 (6), 702-710.
- Allavena, G., Boyd, C., Oo, K.S., Maellaro, E., Zhivotovsky, B., y Kaminsky, V.O., 2016. Suppressed translation and ULK1 degradation as potential mechanisms of autophagy limitation under prolonged starvation. *Autophagy*, 12 (11), 2085-2097.
- Almeida-Suhett, C.P., Graham, A., Chen, Y., y Deuster, P., 2017. Behavioral changes in male mice fed a high-fat diet are associated with IL-1 β expression in specific brain regions. *Physiology & Behavior*, 169, 130-140.
- Alsahli, A., Kiefhaber, K., Gold, T., Muluke, M., Jiang, H., Cremers, S., y Schulze-Späte, U., 2016. Palmitic acid reduces circulating bone formation markers in obese animals and impairs osteoblast activity via C16-ceramide accumulation. *Calcified Tissue International*, 98 (5), 511-519.
- Anand, B.K. y Brobeck, J.R., 1951. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 24 (2), 123-40.
- de Aquino, C.C., Leitão, R.A., Oliveira Alves, L.A., Coelho-Santos, V., Guerrant, R.L., Ribeiro, C.F., Malva, J.O., Silva, A.P., y Oriá, R.B., 2019. Effect of hypoproteic and high-fat diets on hippocampal blood-brain barrier permeability and oxidative stress. *Frontiers in Nutrition*, 5, 131.

- Arevalo, M.A., Azcoitia, I., y Garcia-Segura, L.M., 2015. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 16 (1), 17-29.
- Arner, P. y Rydén, M., 2015. Fatty acids, obesity and insulin resistance. *Obesity Facts*, 8 (2), 147-155.
- Astiz, M., Acáz-Fonseca, E., y Garcia-Segura, L.M., 2014. Sex differences and effects of estrogenic compounds on the expression of inflammatory molecules by astrocytes exposed to the insecticide dimethoate. *Neurotoxicity Research*, 25 (3), 271-285.
- Azcoitia, I., Sierra, A., y Garcia-Segura, L.M., 1999. Localization of estrogen receptor β -immunoreactivity in astrocytes of the adult rat brain. *Glia*, 26 (3), 260-267.
- Azcoitia, I., Sierra, A., Veiga, S., y Garcia-Segura, L.M., 2003. Aromatase expression by reactive astroglia is neuroprotective. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1007, 298-305.
- Bai, L.Y., Weng, J.R., Hu, J.L., Wang, D., Sargeant, A.M., y Chiu, C.F., 2013. G15, a GPR30 antagonist, induces apoptosis and autophagy in human oral squamous carcinoma cells. *Chemico-Biological Interactions*, 206 (2), 375-384.
- Barrett, P., Mercer, J.G., y Morgan, P.J., 2016. Preclinical models for obesity research. *Disease Models & Mechanisms*, 9 (11), 1245-1255.
- El Bawab, S., Birbes, H., Roddy, P., Szulc, Z.M., Bielawska, A., y Hannun, Y.A., 2001. Biochemical characterization of the reverse activity of rat brain ceramidase. A CoA-independent and fumonisín B1-insensitive ceramide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (20), 16758-16766.
- Blázquez, C., Galve-Roperh, I., y Guzmán, M., 2000. De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *The FASEB Journal*, 14 (14), 2315-2322.
- Blommaart, E.F., Luiken, J.J., Blommaart, P.J., Van Woerkom, G.M., y Meijer, A.J., 1995. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (5), 2320-2326.
- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F.M., Wegiel, J., Yu, W.H., y Nixon, R.A., 2008. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 28 (27), 6926-6937.
- Borrás, C., Sastre, J., García-Sala, D., Lloret, A., Pallardó, F. V., y Viña, J., 2003. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (5), 546-552.

- Boya, P., Reggiori, F., y Codogno, P., 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*, 15 (7), 713-20.
- Cai, W., Xue, C., Sakaguchi, M., Konishi, M., Shirazian, A., Ferris, H.A., Li, M.E., Yu, R., Kleinridders, A., Pothos, E.N., y Kahn, C.R., 2018. Insulin regulates astrocyte gliotransmission and modulates behavior. *Journal of Clinical Investigation*, 128 (7), 2914-2926.
- Catalano, M., D'Alessandro, G., Lepore, F., Corazzari, M., Caldarola, S., Valacca, C., Faienza, F., Esposito, V., Limatola, C., Cecconi, F., y Di Bartolomeo, S., 2015. Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Molecular Oncology*, 9 (8), 1612-1625.
- Chaban, Y., Boekema, E.J., y Dudkina, N. V., 2014. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837 (4), 418-426.
- Cheke, L.G., Bonnici, H.M., Clayton, N.S., y Simons, J.S., 2017. Obesity and insulin resistance are associated with reduced activity in core memory regions of the brain. *Neuropsychologia*, 96, 137-149.
- Chen, C.W., Chen, T.Y., Tsai, K.L., Lin, C.L., Yokoyama, K.K., Lee, W. Sen, Chiueh, C.C., y Hsu, C., 2012. Inhibition of autophagy as a therapeutic strategy of iron-induced brain injury after hemorrhage. *Autophagy*, 8 (10), 1510-1520.
- Chen, K.C., Lin, C.M., Huang, C.J., Chen, S.K., Wu, S.T., Chiang, H.S., y Ku, W.C., 2016. Dual roles of 17- β estradiol in estrogen receptor-dependent growth inhibition in renal cell carcinoma. *Cancer Genomics and Proteomics*, 13 (3), 219-230.
- Chen, Z., Nie, S.D., Qu, M.L., Zhou, D., Wu, L.Y., Shi, X.J., Ma, L.R., Li, X., Zhou, S.L., Wang, S., y Wu, J., 2018. The autophagic degradation of Cav-1 contributes to PA-induced apoptosis and inflammation of astrocytes. *Cell Death and Disease*, 9 (7), 771.
- Choi, S., Shin, H., Song, H., y Lim, H.J., 2014. Suppression of autophagic activation in the mouse uterus by estrogen and progesterone. *Journal of Endocrinology*, 221 (1), 39-50.
- Chu, K.Y., O'Reilly, L., Ramm, G., y Biden, T.J., 2015. High-fat diet increases autophagic flux in pancreatic beta cells in vivo and ex vivo in mice. *Diabetologia*, 58 (9), 2074-2078.
- Clegg, D.J., Brown, L.M., Woods, S.C., y Benoit, S.C., 2006. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*, 55 (4), 978-987.

- Cogliati, S., Calvo, E., Loureiro, M., Guaras, A.M., Nieto-Arellano, R., Garcia-Poyatos, C., Ezkurdia, I., Mercader, N., Vázquez, J., y Enriquez, J.A., 2016. Mechanism of super-assembly of respiratory complexes III and IV. *Nature*, 539 (7630), 579-582.
- Coupé, B., Ishii, Y., Dietrich, M.O., Komatsu, M., Horvath, T.L., y Bouret, S.G., 2012. Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation. *Cell Metabolism*, 15 (2), 247-255.
- Demarest, T.G. y McCarthy, M.M., 2015. Sex differences in mitochondrial (dys)function: implications for neuroprotection. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47 (1-2), 173-188.
- Diano, S., Kalra, S.P., y Horvath, T.L., 1998. Leptin receptor immunoreactivity is associated with the Golgi apparatus of hypothalamic neurons and glial cells. *Journal of Neuroendocrinology*, 10 (9), 647-650.
- Dorfman, M.D., Krull, J.E., Douglass, J.D., Fasnacht, R., Lara-Lince, F., Meek, T., Shi, X., Damian, V., Nguyen, H.T., Matsen, M.E., Morton, G.J., y Thaler, J.P., 2017. Sex differences in microglial CX3CR1 signalling determine obesity susceptibility in mice. *Nature Communications*, 8, 14556.
- Douglass, J.D., Dorfman, M.D., Fasnacht, R., Shaffer, L.D., y Thaler, J.P., 2017. Astrocyte IKKB/NF- κ B signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. *Molecular Metabolism*, 6 (4), 366-373.
- Edmond, J., Robbins, R.A., Bergstrom, J.D., Cole, R.A., y de Vellis, J., 1987. Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *Journal of Neuroscience Research*, 18 (4), 551-561.
- Escames, G., Díaz-Casado, M.E., Doerrier, C., Luna-Sánchez, M., López, L.C., y Acuña-Castroviejo, D., 2013. Early gender differences in the redox status of the brain mitochondria with age: effects of melatonin therapy. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 16 (2), 91-100.
- Esteban-Martínez, L. y Boya, P., 2015. Autophagic flux determination in vivo and ex vivo. *Methods*, 75, 79-86.
- Fabelo, N., Martín, V., Santpere, G., Marín, R., Torrent, L., Ferrer, I., y Díaz, M., 2011. Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Molecular Medicine*, 17 (9-10), 1107-1118.
- Fitzwalter, B.E. y Thorburn, A., 2015. Recent insights into cell death and autophagy. *The FEBS Journal*, 282 (22), 4279-4288.

- Florencio-Silva, R., Sasso, G.R.S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., y Cerri, P.S., 2018. Effects of estrogen status in osteocyte autophagy and its relation to osteocyte viability in alveolar process of ovariectomized rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 98, 406-415.
- Frago, L.M., Canelles, S., Freire-Regatillo, A., Argente-Arizón, P., Barrios, V., Argente, J., García-Segura, L.M., y Chowen, J.A., 2017. Estradiol uses different mechanisms in astrocytes from the hippocampus of male and female rats to protect against damage induced by palmitic acid. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 330.
- Franssen, R., Monajemi, H., Stroes, E.S., y Kastelein, J.J., 2011. Obesity and dyslipidemia. *The Medical Clinics of North America*, 95 (5), 893-902.
- Fraser, T., Tayler, H., y Love, S., 2010. Fatty acid composition of frontal, temporal and parietal neocortex in the normal human brain and in Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 35 (3), 503-513.
- Freire-Regatillo, A., Argente-Arizón, P., Argente, J., García-Segura, L.M., y Chowen, J.A., 2017. Non-neuronal cells in the hypothalamic adaptation to metabolic signals. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 51.
- Freire-Regatillo, A., Fernández-Gómez, M.J., Díaz, F., Barrios, V., Sánchez-Jabonero, I., Frago, L.M., Argente, J., García-Segura, L.M., y Chowen, J.A., 2019. Sex differences in the peripubertal response to short-term high fat diet intake. *Journal of Neuroendocrinology*, e12756.
- Fruh, S.M., 2017. Obesity: risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 29 (S1), S3-S14.
- Fuente-Martín, E., García-Cáceres, C., Granado, M., de Ceballos, M.L., Sánchez-Garrido, M.Á. Sarman, B., Liu, Z.W., Dietrich, M.O., Tena-Sempere, M., Argente-Arizón, P., Díaz, F., Argente, J., Horvath, T.L., y Chowen, J.A., 2012. Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 122 (11), 3900-3913.
- Gaignard, P., Savouroux, S., Liere, P., Pianos, A., Thérond, P., Schumacher, M., Slama, A., y Guennoun, R., 2015. Effect of sex differences on brain mitochondrial function and its suppression by ovariectomy and in aged mice. *Endocrinology*, 156 (8), 2893-2904.

- Galluzzi, L., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J.M., Cecconi, F., Choi, A.M., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M.I., Cuervo, A.M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E., Fimia, G.M., Fulda, S., Gewirtz, D.A., Green, D.R., Hansen, M., Harper, J.W., Jäättelä, M., Johansen, T., Juhasz, G., Kimmelman, A.C., Kraft, C., Ktistakis, N.T., Kumar, S., Levine, B., Lopez-Otin, C., Madeo, F., Martens, S., Martinez, J., Melendez, A., Mizushima, N., Münz, C., Murphy, L.O., Penninger, J.M., Piacentini, M., Reggiori, F., Rubinsztein, D.C., Ryan, K.M., Santambrogio, L., Scorrano, L., Simon, A.K., Simon, H., Simonsen, A., Tavernarakis, N., Tooze, S.A., Yoshimori, T., Yuan, J., Yue, Z., Zhong, Q., y Kroemer, G., 2017. Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36 (13), 1811-1836.
- Gao, M., Ma, Y., y Liu, D., 2015. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PLOS ONE*, 10 (3), e0119784.
- Gao, W., Kang, J.H., Liao, Y., Ding, W.X., Gambotto, A.A., Watkins, S.C., Liu, Y.J., Stolz, D.B., y Yin, X.M., 2010. Biochemical isolation and characterization of the tubulovesicular LC3-positive autophagosomal compartment. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (2), 1371-1383.
- García-Cáceres, C., Baland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S.C., Koch, M., Horvath, T.L., Yi, C.X., Chowen, J.A., Verkhatsky, A., Araque, A., Bechmann, I., y Tschöp, M.H., 2019. Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nature Neuroscience*, 22 (1), 7-14.
- García-Cáceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C.X., Le Thuc, O., Szigeti-Buck, K., Cai, W., Meyer, C.W., Pfluger, P.T., Fernandez, A.M., Luquet, S., Woods, S.C., Torres-Alemán, I., Kahn, C.R., Götz, M., Horvath, T.L., y Tschöp, M.H., 2016. Astrocytic insulin signaling couples brain glucose uptake with nutrient availability. *Cell*, 166 (4), 867-880.
- García-Ruiz, I., Solís-Muñoz, P., Fernández-Moreira, D., Muñoz-Yagüe, T., y Solís-Herruzo, J.A., 2015. In vitro treatment of HepG2 cells with saturated fatty acids reproduces mitochondrial dysfunction found in nonalcoholic steatohepatitis. *Disease Models & Mechanisms*, 8 (2), 183-191.
- Gatica, D., Lahiri, V., y Klionsky, D.J., 2018. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature Cell Biology*, 20 (3), 233-242.
- Genova, M.L. y Lenaz, G., 2014. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837 (4), 427-443.

- González-Giraldo, Y., Forero, D.A., Echeverria, V., Garcia-Segura, L.M., y Barreto, G.E., 2019. Tibolone attenuates inflammatory response by palmitic acid and preserves mitochondrial membrane potential in astrocytic cells through estrogen receptor beta. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 486, 65-78.
- González-Giraldo, Y., Garcia-Segura, L.M., Echeverria, V., y Barreto, G.E., 2018. Tibolone preserves mitochondrial functionality and cell morphology in astrocytic cells treated with palmitic acid. *Molecular Neurobiology*, 55 (5), 4453-4462.
- González-Rodríguez, A., Mayoral, R., Agra, N., Valdecantos, M.P., Pardo, V., Miquilena-Colina, M.E., Vargas-Castrillón, J., Lo Iacono, O., Corazzari, M., Fimia, G.M., Piacentini, M., Muntané, J., Boscá, L., García-Monzón, C., Martín-Sanz, P., y Valverde, A.M., 2014. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death and Disease*, 5, e1179.
- Gottesman, R.F., Schneider, A.L., Zhou, Y., Coresh, J., Green, E., Gupta, N., Knopman, D.S., Mintz, A., Rahmim, A., Sharrett, A.R., Wagenknecht, L.E., Wong, D.F., y Mosley, T.H., 2017. Association between midlife vascular risk factors and estimated brain amyloid deposition. *Journal of the American Medical Association*, 317 (14), 1443-1450.
- Grassi, D., Bellini, M.J., Acaz-Fonseca, E., Panzica, G., y Garcia-Segura, L.M., 2013. Estradiol and testosterone regulate arginine-vasopressin expression in SH-SY5Y human female neuroblastoma cells through estrogen receptors- α and - β . *Endocrinology*, 154 (6), 2092-2100.
- Grove, K.L., Fried, S.K., Greenberg, A.S., Xiao, X.Q., y Clegg, D.J., 2010. A microarray analysis of sexual dimorphism of adipose tissues in high-fat-diet-induced obese mice. *International Journal of Obesity*, 34 (6), 989-1000.
- Guevara, R., Gianotti, M., Roca, P., y Oliver, J., 2011. Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial function. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 27 (3-4), 201-206.
- Gunstad, J., Paul, R.H., Cohen, R.A., Tate, D.F., Spitznagel, M.B., y Gordon, E., 2007. Elevated body mass index is associated with executive dysfunction in otherwise healthy adults. *Comprehensive Psychiatry*, 48 (1), 57-61.
- Gupta, S., Knight, A.G., Gupta, S., Keller, J.N., y Bruce-Keller, A.J., 2012. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 120 (6), 1060-1071.

- Haar, L., Ren, X., Liu, Y., Koch, S.E., Goines, J., Tranter, M., Engevik, M.A., Nieman, M., Rubinstein, J., y Jones, W.K., 2014. Acute consumption of a high-fat diet prior to ischemia-reperfusion results in cardioprotection through NF- κ B-dependent regulation of autophagic pathways. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 307 (12), H1705-H1713.
- Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., y Gupte, S.S., 1986. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 18 (5), 331-368.
- Hamazaki, K., Hamazaki, T., y Inadera, H., 2012. Fatty acid composition in the postmortem amygdala of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 46 (8), 1024-1028.
- Hamazaki, K., Hamazaki, T., y Inadera, H., 2013. Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem entorhinal cortex of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Psychiatry Research*, 210 (1), 346-350.
- Hansson, B., Wasserstrom, S., Morén, B., Periwál, V., Vikman, P., Cushman, S.W., Göransson, O., Storm, P., y Stenkula, K.G., 2018. Intact glucose uptake despite deteriorating signaling in adipocytes with high-fat feeding. *Journal of Molecular Endocrinology*, 60 (3), 199-211.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., y Mizushima, N., 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441 (7095), 885-889.
- Harish, G., Venkateshappa, C., Mahadevan, A., Pruthi, N., Bharath, M.M., y Shankar, S.K., 2013. Mitochondrial function in human brains is affected by pre- and post mortem factors. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39 (3), 298-315.
- Hernández-Cáceres, M.P., Toledo-Valenzuela, L., Díaz-Castro, F., Ávalos, Y., Burgos, P., Narro, C., Peña-Oyarzun, D., Espinoza-Cacedo, J., Cifuentes-Araneda, F., Navarro-Aguad, F., Riquelme, C., Troncoso, R., Criollo, A., y Morselli, E., 2019. Palmitic acid reduces the autophagic flux and insulin sensitivity through the activation of the Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) in the hypothalamic neuronal cell line N43/5. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 176.
- Hernandez-Garzón, E., Fernandez, A.M., Perez-Alvarez, A., Genis, L., Bascuñana, P., Fernandez de la Rosa, R., Delgado, M., Angel Pozo, M., Moreno, E., McCormick, P.J., Santi, A., Trueba-Saiz, A., Garcia-Caceres, C., Tschöp, M.H., Araque, A., Martin, E.D., y Torres Aleman, I., 2016. The insulin-like growth factor I receptor regulates glucose transport by astrocytes. *Glia*, 64 (11), 1962-1971.

- Hong, J., Stubbins, R.E., Smith, R.R., Harvey, A.E., y Núñez, N.P., 2009. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. *Nutrition Journal*, 8, 11.
- Horvath, T.L., Sarman, B., García-Cáceres, C., Enriori, P.J., Sotonyi, P., Shanabrough, M., Borok, E., Argente, J., Chowen, J.A., Perez-Tilve, D., Pfluger, P.T., Brönneke, H.S., Levin, B.E., Diano, S., Cowley, M.A., y Tschöp, M.H., 2010. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (33), 14875-14880.
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., y Spiegelman, B.M., 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 95 (5), 2409-2415.
- Hruby, A. y Hu, F.B., 2015. The epidemiology of obesity: a big picture. *Pharmacoeconomics.*, 33 (7), 673-689.
- Hussain, G., Schmitt, F., Loeffler, J.P., y Gonzalez de Aguilar, J.L., 2013. Fattening the brain: a brief of recent research. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 144.
- Ignacio-Souza, L.M., Bombassaro, B., Pascoal, L.B., Portovedo, M.A., Razolli, D.S., Coope, A., Victorio, S.C., De Moura, R.F., Nascimento, L.F., Arruda, A.P., Anhe, G.F., Milanski, M., y Velloso, L.A., 2014. Defective regulation of the ubiquitin/proteasome system in the hypothalamus of obese male mice. *Endocrinology*, 155 (8), 2831-2844.
- Jaeger, P.A. y Coray, T.W., 2009. All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration and neuroprotection. *Molecular Neurodegeneration*, 4, 16.
- Jha, P., Wang, X., y Auwerx, J., 2016. Analysis of mitochondrial respiratory chain supercomplexes using blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). *Current Protocols in Mouse Biology*, 6 (1), 1-14.
- Ji, C.H. y Kwon, Y.T., 2017. Crosstalk and interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Molecules and Cells*, 40 (7), 441-449.
- Jonckheere, A.I., Smeitink, J.A., y Rodenburg, R.J., 2012. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35 (2), 211-225.
- Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., y Kim, D.H., 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular Biology of the Cell*, 20 (7), 1992-2003.

- Jung, T.W., Hong, H.C., Hwang, H.J., Yoo, H.J., Baik, S.H., y Choi, K.M., 2015. C1q/TNF-Related Protein 9 (CTRP9) attenuates hepatic steatosis via the autophagy-mediated inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 417, 131-140.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., y Yoshimori, T., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19 (21), 5720-5728.
- Karmi, A., Iozzo, P., Viljanen, A., Hirvonen, J., Fielding, B.A., Virtanen, K., Oikonen, V., Kemppainen, J., Viljanen, T., Guiducci, L., Haaparanta-Solin, M., Nagren, K., Solin, O., y Nuutila, P., 2010. Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome. *Diabetes*, 59 (9), 2171-2177.
- Kaushik, S., Arias, E., Kwon, H., Lopez, N.M., Athonvarangkul, D., Sahu, S., Schwartz, G.J., Pessin, J.E., y Singh, R., 2012. Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis. *EMBO reports*, 13 (3), 258-265.
- Kaushik, S., Rodriguez-Navarro, J.A., Arias, E., Kiffin, R., Sahu, S., Schwartz, G.J., Cuervo, A.M., y Singh, R., 2011. Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. *Cell Metabolism*, 14 (2), 173-183.
- Keilin, D. y Hartree, E.F., 1974. Activity of the cytochrome system in heart muscle preparations. *The Biochemical Journal*, 41 (4), 500-502.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., y Guan, K.L., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13 (2), 132-141.
- Kim, J.G., Suyama, S., Koch, M., Jin, S., Argente-Arizon, P., Argente, J., Liu, Z.W., Zimmer, M.R., Jeong, J.K., Szigeti-Buck, K., Gao, Y., Garcia-Caceres, C., Yi, C.X., Salmaso, N., Vaccarino, F.M., Chowen, J., Diano, S., Dietrich, M.O., Tschöp, M.H., y Horvath, T.L., 2014. Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nature Neuroscience*, 17 (7), 908-910.
- Kimmelman, A.C. y White, E., 2017. Autophagy and tumor metabolism. *Cell Metabolism*, 25 (5), 1037-1043.
- Kivipelto, M., Ngandu, T., Fratiglioni, L., Viitanen, M., Kåreholt, I., Winblad, B., Helkala, E.L., Tuomilehto, J., Soininen, H., y Nissinen, A., 2005. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 62 (10), 1556-1560.

- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., Adhietty, P.J., Adler, S.G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M.K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P.V., Aguirre-Ghiso, J., Airoidi, E.M., Ait-Si-Ali, S., Akematsu, T., Akporiaye, E.T., y Zughaier, S.M., 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12 (1), 1-222.
- Koga, H., Kaushik, S., y Cuervo, A.M., 2010. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *The FASEB Journal*, 24 (8), 3052-3065.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J.I., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., y Tanaka, K., 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441 (7095), 880-884.
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J.I., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S.I., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., y Tanaka, K., 2007. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 131 (6), 1149-1163.
- Kovács, A.L., Pálfi, Z., Réz, G., Vellai, T., y Kovács, J., 2007. Sequestration revisited: integrating traditional electron microscopy, de novo assembly and new results. *Autophagy*, 3 (6), 655-662.
- Kovářová, N., Mráček, T., Nůsková, H., Holzerová, E., Vrbacký, M., Pecina, P., Hejzlarová, K., Klůčková, K., Rohlena, J., Neuzil, J., y Houšťek, J., 2013. High molecular weight forms of mammalian respiratory chain complex II. *PLOS ONE*, 8 (8), e71869.
- Kuo, J., Hamid, N., Bondar, G., Dewing, P., Clarkson, J., y Micevych, P., 2010. Sex differences in hypothalamic astrocyte response to estradiol stimulation. *Biology of Sex Differences*, 1 (1), 7.
- Kuo, J., Hamid, N., Bondar, G., Prossnitz, E.R., y Micevych, P., 2010. Membrane estrogen receptors stimulate intracellular calcium release and progesterone synthesis in hypothalamic astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 30 (39), 12950-12957.
- Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P.M., Calvo, E., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, Á., López-Otín, C., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Fernández-Vizarra, E., y Enríquez, J.A., 2013. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science*, 340 (6140), 1567-1570.

- Las, G., Serada, S.B., Wikstrom, J.D., Twig, G., y Shirihai, O.S., 2011. Fatty acids suppress autophagic turnover in β -cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (49), 42534-42544.
- Levine, B. y Kroemer, G., 2019. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective. *Cell*, 176 (1-2), 11-42.
- Lewis, D.K., Johnson, A.B., Stohlgren, S., Harms, A., y Sohrabji, F., 2008. Effects of estrogen receptor agonists on regulation of the inflammatory response in astrocytes from young adult and middle-aged female rats. *Journal of Neuroimmunology*, 195 (1-2), 47-59.
- Lin, C.W., Chen, B., Huang, K.L., Dai, Y. Sen, y Teng, H.L., 2016. Inhibition of autophagy by estradiol promotes locomotor recovery after spinal cord injury in rats. *Neuroscience Bulletin*, 32 (2), 137-144.
- Liu, E.Y. y Ryan, K.M., 2012. Autophagy and cancer - issues we need to digest. *Journal of Cell Science*, 125 (10), 2349-2358.
- Liu, L., Martin, R., y Chan, C., 2013. Palmitate-activated astrocytes via serine palmitoyltransferase increase BACE1 in primary neurons by sphingomyelinases. *Neurobiology of Aging*, 34 (2), 540-550.
- Liu, T., Chen, X.M., Sun, J.Y., Jiang, X.S., Wu, Y., Yang, S., Huang, H.Z., Ruan, X.Z., y Du, X.G., 2018. Palmitic acid-induced podocyte apoptosis via the reactive oxygen species-dependent mitochondrial pathway. *Kidney and Blood Pressure Research*, 43 (1), 206-219.
- Liu, X., Tian, F., Wang, S., Wang, F., y Xiong, L., 2018. Astrocyte autophagy flux protects neurons against oxygen-glucose deprivation and ischemic/reperfusion injury. *Rejuvenation Research*, 21 (5), 405-415.
- Lopez-Fabuel, I., Le Douce, J., Logan, A., James, A.M., Bonvento, G., Murphy, M.P., Almeida, A., y Bolaños, J.P., 2016. Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (46), 13063-13068.
- Loram, L.C., Sholar, P.W., Taylor, F.R., Wiesler, J.L., Babb, J.A., Strand, K.A., Berkelhammer, D., Day, H.E., Maier, S.F., y Watkins, L.R., 2012. Sex and estradiol influence glial pro-inflammatory responses to lipopolysaccharide in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 37 (10), 1688-1699.
- Lou, J., Wang, Y., Wang, X., y Jiang, Y., 2014. Uncoupling protein 2 regulates palmitic acid-induced hepatoma cell autophagy. *BioMed Research International*, 2014, 810401.

- Lutz, T.A. y Woods, S.C., 2012. Overview of animal models of obesity. *Current Protocols in Pharmacology*, Chapter 5, Unit5.61.
- Macotela, Y., Boucher, J., Tran, T.T., y Kahn, C.R., 2009. Gender and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes*, 58 (4), 803-812.
- Di Malta, C., Fryer, J.D., Settembre, C., y Ballabio, A., 2012. Astrocyte dysfunction triggers neurodegeneration in a lysosomal storage disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (35), E2334-E2342.
- Marín-Royo, G., Gallardo, I., Martínez-Martínez, E., Gutiérrez, B., Jurado-López, R., López-Andrés, N., Gutiérrez-Tenorio, J., Rial, E., Bartolomé, M.V., Nieto, M.L., y Cachofeiro, V., 2018. Inhibition of galectin-3 ameliorates the consequences of cardiac lipotoxicity in a rat model of diet-induced obesity. *Disease Models & Mechanisms*, 11 (2), dmm032086.
- De Marinis, E., Acáz-Fonseca, E., Arevalo, M.A., Ascenzi, P., Fiocchetti, M., Marino, M., y Garcia-Segura, L.M., 2013. 17 β -Oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor β -mediated neuroglobin up-regulation. *Journal of Neuroendocrinology*, 25 (3), 260-270.
- Martinez-Lopez, N., Garcia-Macia, M., Sahu, S., Athonvarangkul, D., Liebling, E., Merlo, P., Cecconi, F., Schwartz, G.J., y Singh, R., 2016. Autophagy in the CNS and periphery coordinate lipophagy and lipolysis in the brown adipose tissue and liver. *Cell Metabolism*, 23 (1), 113-127.
- Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D.J., y Hevener, A.L., 2013. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocrine Reviews*, 34 (3), 309-338.
- McElroy, J.F. y Wade, G.N., 1987. Short- and long-term effects of ovariectomy on food intake, body weight, carcass composition, and brown adipose tissue in rats. *Physiology & Behavior*, 39 (3), 361-365.
- McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D.R., y Ryan, M.T., 2006. Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth syndrome patients. *Journal of Molecular Biology*, 361 (3), 462-469.
- Mei, S., Ni, H.M., Manley, S., Bockus, A., Kassel, K.M., Luyendyk, J.P., Copple, B.L., y Ding, W.X., 2011. Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 339 (2), 487-498.

- Meng, Q. y Cai, D., 2011. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I κ B kinase β (IKK β)/NF- κ B pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (37), 32324-32332.
- Miller, S.J., 2018. Astrocyte heterogeneity in the adult central nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 401.
- Milner, T.A., McEwen, B.S., Hayashi, S., Li, C.J., Reagan, L.P., y Alves, S.E., 2001. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *The Journal of Comparative Neurology*, 429 (3), 355-371.
- Mir, S.U., George, N.M., Zahoor, L., Harms, R., Guinn, Z., y Sarvetnick, N.E., 2015. Inhibition of autophagic turnover in β -cells by fatty acids and glucose leads to apoptotic cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, 290 (10), 6071-6085.
- Mizushima, N., 2018. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nature Cell Biology*, 20 (5), 521-527.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., y Ohsumi, Y., 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell*, 15 (3), 1101-1111.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., y Levine, B., 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140 (3), 313-326.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., y Ohsumi, Y., 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 107-132.
- Molteni, R., Barnard, R.J., Ying, Z., Roberts, C.K., y Gómez-Pinilla, F., 2002. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience*, 112 (4), 803-814.
- Montgomery, M.K., Hallahan, N.L., Brown, S.H., Liu, M., Mitchell, T.W., Cooney, G.J., y Turner, N., 2013. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*, 56 (5), 1129-1139.
- Morrison, C.D., Pistell, P.J., Ingram, D.K., Johnson, W.D., Liu, Y., Fernandez-Kim, S.O., White, C.L., Purpera, M.N., Uranga, R.M., Bruce-Keller, A.J., y Keller, J.N., 2010. High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling. *Journal of Neurochemistry*, 114 (6), 1581-1589.

- Morselli, E., Criollo, A., Rodriguez-Navas, C., y Clegg, D.J., 2015. Chronic high fat diet consumption impairs metabolic health of male mice. *Inflammation and Cell Signaling*, 1 (6), e561.
- Morselli, E., Fuente-Martin, E., Finan, B., Kim, M., Frank, A., Garcia-Caceres, C., Navas, C.R., Gordillo, R., Neinast, M., Kalainayakan, S.P., Li, D.L., Gao, Y., Yi, C.X., Hahner, L., Palmer, B.F., Tschöp, M.H., y Clegg, D.J., 2014. Hypothalamic PGC-1 α protects against high-fat diet exposure by regulating ER α . *Cell Reports*, 9 (2), 633-645.
- Morselli, E., Santos, R.S., Gao, S., Ávalos, Y., Criollo, A., Palmer, B.F., y Clegg, D.J., 2018. Impact of estrogens and estrogen receptor- α in brain lipid metabolism. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 315 (1), E7-E14.
- Moruno-Manchon, J.F., Uzor, N.E., Ambati, C.R., Shetty, V., Putluri, N., Jagannath, C., McCullough, L.D., y Tsvetkov, A.S., 2018. Sphingosine kinase 1-associated autophagy differs between neurons and astrocytes. *Cell Death and Disease*, 9 (5), 521.
- Motori, E., Puyal, J., Toni, N., Ghanem, A., Angeloni, C., Malaguti, M., Cantelli-Forti, G., Berninger, B., Conzelmann, K.K., Götz, M., Winklhofer, K.F., Hrelia, S., y Bergami, M., 2013. Inflammation-induced alteration of astrocyte mitochondrial dynamics requires autophagy for mitochondrial network maintenance. *Cell Metabolism*, 18 (6), 844-859.
- Murphy, M.P., 2008. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417 (1), 1-13.
- Musatov, S., Chen, W., Pfaff, D.W., Mobbs, C. V., Yang, X.J., Clegg, D.J., Kaplitt, M.G., y Ogawa, S., 2007. Silencing of estrogen receptor α in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (7), 2501-2506.
- Nikoletopoulou, V., Papandreou, M.E., y Tavernarakis, N., 2015. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death and Differentiation*, 22 (3), 398-407.
- Nsiah-Sefaa, A. y McKenzie, M., 2016. Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid β -oxidation in mitochondrial disease. *Bioscience Reports*, 36 (2), pii: e00313.
- Oliveira, A.A.B., Melo, N.F.M., Vieira, É.D.S., Nogueira, P.A.S., Coope, A., Velloso, L.A., Dezone, R.S., Ueira-Vieira, C., Botelho, F.V., Gomes, J.A.S., y Zanon, R.G., 2018. Palmitate treated-astrocyte conditioned medium contains increased glutathione and interferes in hypothalamic synaptic network in vitro. *Neurochemistry International*, 120, 140-148.

- Organización Mundial de la Salud, 2018. Obesity and overweight [online]. Disponible en: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> [Accedido 28 jun 2019].
- Ostrander, D.B., Sparagna, G.C., Amoscato, A.A., McMillin, J.B., y Dowhan, W., 2001. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (41), 38061-38067.
- Oyadomari, S. y Mori, M., 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death and Differentiation*, 11 (4), 381-389.
- Palmer, B.F. y Clegg, D.J., 2015. The sexual dimorphism of obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 402, 113-119.
- Pamenter, M.E., Perkins, G.A., McGinness, A.K., Gu, X.Q., Ellisman, M.H., y Haddad, G.G., 2012. Autophagy and apoptosis are differentially induced in neurons and astrocytes treated with an in vitro mimic of the ischemic penumbra. *PLOS ONE*, 7 (12), e51469.
- Papáčková, Z., Daňková, H., Páleníčková, E., Kazdová, L., y Cahová, M., 2012. Effect of short- and long-term high-fat feeding on autophagy flux and lysosomal activity in rat liver. *Physiological Research*, 61 (Suppl 2), S67-S76.
- Park, E.J., Lee, A.Y., Park, S., Kim, J.H., y Cho, M.H., 2014. Multiple pathways are involved in palmitic acid-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 67, 26-34.
- Patil, S., Melrose, J., y Chan, C., 2007. Involvement of astroglial ceramide in palmitic acid-induced Alzheimer-like changes in primary neurons. *European Journal of Neuroscience*, 26 (8), 2131-2141.
- Paxinos, G. y Franklin, K.B.J., 2004. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2ª edición. Gulf Professional Publishing.
- Pei, H., Wang, W., Zhao, D., Su, H., Su, G., y Zhao, Z., 2019. G protein-coupled estrogen receptor 1 inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy via the regulation of PI3K-Akt-mTOR signalling and autophagy. *International Journal of Biological Sciences*, 15 (1), 81-92.
- Pettersson, U.S., Waldén, T.B., Carlsson, P.O., Jansson, L., y Phillipson, M., 2012. Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. *PLOS ONE*, 7 (9), e46057.

- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9), e45.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., y Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26 (6), 509-515.
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L., y Schägger, H., 2003. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (52), 52873-52880.
- Pierdominici, M., Maselli, A., Locatelli, S.L., Ciarlo, L., Careddu, G., Patrizio, M., Ascione, B., Tinari, A., Carlo-Stella, C., Malorni, W., Matarrese, P., y Ortona, E., 2017. Estrogen receptor β ligation inhibits Hodgkin lymphoma growth by inducing autophagy. *Oncotarget*, 8 (5), 8522-8535.
- Pilitsis, J.G., Diaz, F.G., O'Regan, M.H., y Phillis, J.W., 2002. Differential effects of phospholipase inhibitors on free fatty acid efflux in rat cerebral cortex during ischemia-reperfusion injury. *Brain Research*, 951 (1), 96-106.
- Portovedo, M., Ignacio-Souza, L.M., Bombassaro, B., Coope, A., Reginato, A., Razolli, D.S., Torsoni, M.A., Torsoni, A.S., Leal, R.F., Velloso, L.A., y Milanski, M., 2015. Saturated fatty acids modulate autophagy's proteins in the hypothalamus. *PLOS ONE*, 10 (3), e0119850.
- Profenno, L.A., Porsteinsson, A.P., y Faraone, S.V., 2010. Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biological Psychiatry*, 67 (6), 505-512.
- Qian, M., Fang, X., y Wang, X., 2017. Autophagy and inflammation. *Clinical and Translational Medicine*, 6 (1), 24.
- Quan, W., Kim, H.K., Moon, E.Y., Kim, S.S., Choi, C.S., Komatsu, M., Jeong, Y.T., Lee, M.K., Kim, K.W., Kim, M.S., y Lee, M.S., 2012. Role of hypothalamic proopiomelanocortin neuron autophagy in the control of appetite and leptin response. *Endocrinology*, 153 (4), 1817-1826.
- Raji, C.A., Ho, A.J., Parikshak, N.N., Becker, J.T., Lopez, O.L., Kuller, L.H., Hua, X., Leow, A.D., Toga, A.W., y Thompson, P.M., 2010. Brain structure and obesity. *Human Brain Mapping*, 31 (3), 353-364.
- Rodriguez-Navas, C., Morselli, E., y Clegg, D.J., 2016. Sexually dimorphic brain fatty acid composition in low and high fat diet-fed mice. *Molecular Metabolism*, 5 (8), 680-689.

- Sahani, M.H., Itakura, E., y Mizushima, N., 2014. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy*, 10 (3), 431-441.
- Sano, R. y Reed, J.C., 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833 (12), 3460-3470.
- Santos-Galindo, M., Acáz-Fonseca, E., Bellini, M.J., y García-Segura, L.M., 2011. Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide. *Biology of Sex Differences*, 2, 7.
- Schägger, H. y Pfeiffer, K., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19 (8), 1777-1783.
- Schwartz, M.W. y Porte, D., 2005. Diabetes, obesity, and the brain. *Science*, 307 (5708), 375-379.
- Seeley, R.J. y Woods, S.C., 2003. Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. *Nature Reviews Neuroscience*, 4 (11), 901-909.
- Sharpe, A. y McKenzie, M., 2018. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders associated with short-chain enoyl-CoA hydratase (ECHS1) deficiency. *Cells*, 7 (6), pii: E46.
- Simonovitch, S., Schumker, E., Bepalko, A., Iram, T., Frenkel, D., Holtzman, D.M., Masliah, E., Michaelson, D.M., y Pinkas-Kramarski, R., 2016. Impaired autophagy in APOE4 astrocytes. *Journal of Alzheimer's Disease*, 51 (3), 915-927.
- Simpkins, J.W., Yang, S.H., Sarkar, S.N., y Pearce, V., 2008. Estrogen actions on mitochondria-physiological and pathological implications. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290 (1-2), 51-59.
- Singh, R. y Cuervo, A.M., 2011. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metabolism*, 13 (5), 495-504.
- Singh, R. y Cuervo, A.M., 2012. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 282041.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., y Czaja, M.J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458 (7242), 1131-1135.
- Smith, Q.R. y Nagura, H., 2001. Fatty acid uptake and incorporation in brain: studies with the perfusion model. *Journal of Molecular Neuroscience*, 16 (2-3), 167-172; discusión 215-221.

- Sobolewska, A., Gajewska, M., Zarzyńska, J., Gajkowska, B., y Motyl, T., 2009. IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. *European Journal of Cell Biology*, 88 (2), 117-130.
- Son, S.M., Song, H., Byun, J., Park, K.S., Jang, H.C., Park, Y.J., y Mook-Jung, I., 2012. Altered APP processing in insulin-resistant conditions is mediated by autophagosome accumulation via the inhibition of mammalian target of rapamycin pathway. *Diabetes*, 61 (12), 3126-3138.
- Song, C., Mitter, S.K., Qi, X., Beli, E., Rao, H. V., Ding, J., Ip, C.S., Gu, H., Akin, D., Dunn, W.A., Rickman, C.B., Lewin, A.S., Grant, M.B., y Boulton, M.E., 2017. Oxidative stress-mediated NFκB phosphorylation upregulates p62/SQSTM1 and promotes retinal pigmented epithelial cell survival through increased autophagy. *PLOS ONE*, 12 (2), e0171940.
- De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J., y Velloso, L.A., 2005. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, 146 (10), 4192-4199.
- Spence, R.D., Wisdom, A.J., Cao, Y., Hill, H.M., Mongerson, C.R., Stapornkul, B., Itoh, N., Sofroniew, M. V., y Voskuhl, R.R., 2013. Estrogen mediates neuroprotection and anti-inflammatory effects during EAE through ERα signaling on astrocytes but not through ERβ signaling on astrocytes or neurons. *Journal of Neuroscience*, 33 (26), 10924-10933.
- Stranahan, A.M., Norman, E.D., Lee, K., Cutler, R.G., Telljohann, R.S., Egan, J.M., y Mattson, M.P., 2008. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*, 18 (11), 1085-1088.
- Sutton, M., Huang, G., Zhou, J., Mao, W., Langley, R., Lu, Z., y Bast, R.J., 2019. Amino acid deprivation-induced autophagy requires upregulation of DIRAS3 through reduction of E2F1 and E2F4 transcriptional repression. *Cancers*, 11 (5), pii: E603.
- Tao, Z., Zheng, L.D., Smith, C., Luo, J., Robinson, A., Almeida, F.A., Wang, Z., Olumi, A.F., Liu, D., y Cheng, Z., 2018. Estradiol signaling mediates gender difference in visceral adiposity via autophagy. *Cell Death and Disease*, 9 (3), 309.
- Thaler, J.P., Yi, C.X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., Zhao, X., Sarruf, D.A., Izgur, V., Maravilla, K.R., Nguyen, H.T., Fischer, J.D., Matsen, M.E., Wisse, B.E., Morton, G.J., Horvath, T.L., Baskin, D.G., Tschöp, M.H., y Schwartz, M.W., 2012. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 122 (1), 153-162.

- Timper, K. y Brüning, J.C., 2017. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Disease Models & Mechanisms*, 10 (6), 679-689.
- Trudeau, K.M., Colby, A.H., Zeng, J., Las, G., Feng, J.H., Grinstaff, M.W., y Shirihai, O.S., 2016. Lysosome acidification by photoactivated nanoparticles restores autophagy under lipotoxicity. *Journal of Cell Biology*, 214 (1), 25-34.
- Tsukada, M. y Ohsumi, Y., 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 333 (1-2), 169-174.
- Valdearcos, M., Robblee, M.M., Benjamin, D.I., Nomura, D.K., Xu, A.W., y Koliwad, S.K., 2014. Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function. *Cell Reports*, 9 (6), 2124-2138.
- Venancio, J.C., Margatho, L.O., Rorato, R., Rosales, R.R.C., Debarba, L.K., Coletti, R., Antunes-Rodrigues, J., Elias, C.F., y Elias, L.L.K., 2017. Short-term high-fat diet increases leptin activation of CART neurons and advances puberty in female mice. *Endocrinology*, 158 (11), 3929-3942.
- Ventura-Clapier, R., Moulin, M., Piquereau, J., Lemaire, C., Mericskay, M., Veksler, V., y Garnier, A., 2017. Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies. *Clinical Science*, 131 (9), 803-822.
- Verkhatsky, A. y Nedergaard, M., 2017. Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, 98 (1), 239-389.
- Vicente-Gutierrez, C., Bonora, N., Bobo-Jimenez, V., Jimenez-Blasco, D., Lopez-Fabuel, I., Fernandez, E., Josephine, C., Bonvento, G., Enriquez, J.A., Almeida, A., y Bolaños, J.P., 2019. Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour. *Nature Metabolism*, 1 (2), 201-211.
- Voigt, A., Agnew, K., van Schothorst, E.M., Keijer, J., y Klaus, S., 2013. Short-term, high fat feeding-induced changes in white adipose tissue gene expression are highly predictive for long-term changes. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57 (8), 1423-1434.
- Wang, F., Xiao, J., Shen, Y., Yao, F., y Chen, Y., 2014. Estrogen protects cardiomyocytes against lipopolysaccharide by inhibiting autophagy. *Molecular Medicine Reports*, 10 (3), 1509-1512.
- Wang, X.S., Tian, Z., Zhang, N., Han, J., Guo, H.L., Zhao, M.G., y Liu, S.B., 2016. Protective effects of gastrodin against autophagy-mediated astrocyte death. *Phytotherapy Research*, 30 (3), 386-396.

- Wang, Z., Liu, D., Wang, J., Liu, S., Gao, M., Ling, E.A., y Hao, A., 2012. Cytoprotective effects of melatonin on astroglial cells subjected to palmitic acid treatment in vitro. *Journal of Pineal Research*, 52 (2), 253-264.
- Ward, M.A., Carlsson, C.M., Trivedi, M.A., Sager, M.A., y Johnson, S.C., 2005. The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study. *BMC Neurology*, 5, 23.
- Waterson, M.J. y Horvath, T.L., 2015. Neuronal regulation of energy homeostasis: beyond the hypothalamus and feeding. *Cell Metabolism*, 22 (6), 962-970.
- Williams, L.M., Campbell, F.M., Drew, J.E., Koch, C., Hoggard, N., Rees, W.D., Kamolrat, T., Ngo, H.T., Steffensen, I.L., Gray, S.R., y Tups, A., 2014. The development of diet-induced obesity and glucose intolerance in C57BL/6 mice on a high-fat diet consists of distinct phases. *PLOS ONE*, 9 (8), e106159.
- Wong, K.L., Wu, Y.R., Cheng, K.S., Chan, P., Cheung, C.W., Lu, D.Y., Su, T.H., Liu, Z.M., y Leung, Y.M., 2014. Palmitic acid-induced lipotoxicity and protection by (+)-catechin in rat cortical astrocytes. *Pharmacological Reports*, 66 (6), 1106-1113.
- Xu, X., Hua, Y., Nair, S., Zhang, Y., y Ren, J., 2013. Akt2 knockout preserves cardiac function in high-fat diet-induced obesity by rescuing cardiac autophagosome maturation. *Journal of Molecular Cell Biology*, 5 (1), 61-63.
- Yamahara, K., Yasuda, M., Kume, S., Koya, D., Maegawa, H., y Uzu, T., 2013. The role of autophagy in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Research*, 2013, 193757.
- Yamato, M., Shiba, T., Yoshida, M., Ide, T., Seri, N., Kudou, W., Kinugawa, S., y Tsutsui, H., 2007. Fatty acids increase the circulating levels of oxidative stress factors in mice with diet-induced obesity via redox changes of albumin. *FEBS Journal*, 274 (15), 3855-3863.
- Yang, Y.H., Chen, K., Li, B., Chen, J.W., Zheng, X.F., Wang, Y.R., Jiang, S.D., y Jiang, L.S., 2013. Estradiol inhibits osteoblast apoptosis via promotion of autophagy through the ER-ERK-mTOR pathway. *Apoptosis*, 18 (11), 1363-1375.
- Yin, Z., Pascual, C., y Klionsky, D.J., 2016. Autophagy: machinery and regulation. *Microbial Cell*, 3 (12), 588-596.
- Zeng, M., Chen, B., Qing, Y., Xie, W., Dang, W., Zhao, M., y Zhou, J., 2014. Estrogen receptor β signaling induces autophagy and downregulates Glut9 expression. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 33 (7), 455-465.


Zhang, Y., Reichel, J.M., Han, C., Zuniga-Hertz, J.P., y Cai, D., 2017. Astrocytic process plasticity and IKK β /NF- κ B in central control of blood glucose, blood pressure, and body weight. *Cell Metabolism*, 25 (5), 1091-1102.

Anexo I

Publicación de la tesis doctoral



Lipotoxic Effects of Palmitic Acid on Astrocytes Are Associated with Autophagy Impairment

Ana Ortiz-Rodriguez¹ · Estefania Acaz-Fonseca^{1,2} · Patricia Boya³ · Maria Angeles Arevalo^{1,2}  · Luis M. Garcia-Segura^{1,2}

Received: 19 March 2018 / Accepted: 7 June 2018 / Published online: 18 June 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Obesity is associated with an increase in the brain levels of saturated free fatty acids, such as palmitic acid (PA). Previous studies have shown that PA exerts proinflammatory actions and reduces cell viability in astrocyte cultures. In this study, we have assessed whether an alteration in autophagy is involved in the effects of PA on astrocytes. Primary astrocytes were obtained from the cerebral cortex of male and female CD1 mouse pups and were incubated for 4.5 or 24 h with 250–500 μ M PA. PA increased the levels of LC3-II, an autophagosome marker, and reduced LC3-II flux in astrocytes, suggesting a blockade of autophagy. This effect was observed both after 4.5 and 24 h of treatment with PA. PA had additional effects after treatment for 24 h, increasing the expression of proinflammatory cytokines, decreasing cell viability, and increasing the levels of an endoplasmic reticulum stress marker. In addition, PA decreased the expression of estrogen receptors, but only in female astrocytes. However, the treatment with estradiol, estrogen receptor agonists, or inhibitor of estradiol synthesis did not counteract the action of PA on cell viability. Rapamycin, an autophagy inducer, was unable to prevent the effect of PA on cell viability. In addition, hydroxychloroquine, an autophagy blocker, did not cause per se astrocyte death. These findings suggest that the effect of PA on autophagy is not sufficient to induce astrocyte loss, which is only observed when prolonged PA treatment causes other alterations in astrocytes, such as increased inflammation and endoplasmic reticulum stress.

Keywords Autophagic flux · Estrogen receptors · LC3-II · Proinflammatory cytokines · Sex differences

La publicación completa se encuentra disponible en Springer Nature a través del siguiente enlace:

<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-018-1183-9>

Anexo II

Otras publicaciones

Sex differences and gonadal hormone regulation of brain cardiolipin, a key mitochondrial phospholipid

Estefania Acaz-Fonseca^{1,2} | Ana Ortiz-Rodriguez¹ | Luis Miguel Garcia-Segura^{1,2} | Mariana Astiz³ 

¹Instituto Cajal-CSIC, Madrid, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

³Institute of Neurobiology, Center of Brain Behavior and Metabolism (CBBM), University of Lübeck, Lübeck, Germany

Correspondence

Mariana Astiz, Institute of Neurobiology, Center of Brain Behavior and Metabolism (CBBM), Marie-Curie-StraÙe, University of Lübeck, 23562, Lübeck, Germany.
Email: marianaastiz@gmail.com

Funding information

German Research Foundation, Grant/Award Number: AS547-1/1; Agencia Estatal de Investigación, Spain, Grant/Award Number: BFU2017-82754-R; Centro de Investigación Biomédica en Red Fragilidad y Envejecimiento Saludable; Instituto de Salud Carlos III, Spain; Fondos FEDER

Abstract

Cardiolipin (CL) is a phospholipid that is almost exclusively located in the inner mitochondrial membrane of eukaryotic cells. As a result of its unique structure and distribution, CL establishes non-covalent bonds with a long list of proteins involved in ATP production, mitochondria biogenesis, mitophagy and apoptosis. Thus, the amount of CL, as well as its fatty acid composition and location, strongly impacts upon mitochondrial-dependent functions and therefore the metabolic homeostasis of different tissues. The brain is particularly sensitive to mitochondrial dysfunction as a result of its high metabolic demand. Several mitochondrial related-neurodegenerative disorders, as well as physiological ageing, show altered CL metabolism. Furthermore, mice lacking enzymes involved in CL synthesis show cognitive impairments. CL content and metabolism are regulated by gonadal hormones in the developing and adult brain. In neuronal cultures, oestradiol increases CL content, whereas adult ovariectomy decreases CL content and alters CL metabolism in the hippocampal mitochondria. Transient sex differences in brain CL metabolism have been detected during development. At birth, brain CL has a higher proportion of unsaturated fatty acids in the brain of male mice than in the brain of females. In addition, the expression of enzymes involved in CL de novo and recycling synthetic pathways is higher in males. Most of these sex differences are abolished by the neonatal androgenisation of females, suggesting a role for testosterone in the generation of sex differences in brain CL. The regulation of brain CL by gonadal hormones may be linked to their homeostatic and protective actions in neural cells, as well as the manifestation of sex differences in neurodegenerative disorders.

KEYWORDS

brain development, cardiolipin, mitochondria, sex differences, testosterone

Estefania Acaz-Fonseca and Ana Ortiz-Rodriguez contributed equally to this work

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2019 The Authors. *Journal of Neuroendocrinology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Society for Neuroendocrinology

Journal of Neuroendocrinology. 2019;e12774.
<https://doi.org/10.1111/jne.12774>

wileyonlinelibrary.com/journal/jne | 1 of 9

ARTICLE

Open Access

Notch signaling in astrocytes mediates their morphological response to an inflammatory challenge

Estefania Acáz-Fonseca^{1,2}, Ana Ortiz-Rodríguez¹, Iñigo Azcoitia^{2,3}, Luis M. García-Segura^{1,2} and Maria-Angeles Arevalo^{1,2}

Abstract

In the nervous system, Notch pathway has a prominent role in the control of neuronal morphology and in the determination of the astrocyte fate. However, the role of Notch in morphological astrocyte plasticity is unknown. Here, we have explored the role of Notch activity on the morphological reactivity of primary astrocytes in response to LPS, an inflammatory stimulus. We found that LPS induces reactive astrocyte morphology by the inhibition of Notch signaling via NFκB activation and Jagged upregulation. In contrast, IGF-1, an anti-inflammatory molecule, inhibits LPS-induced reactive astrocyte morphological phenotype by enhancing Notch signaling through the inhibition of NFκB and the activation of MAPK. Therefore, Notch signaling pathway emerges as a mediator of the regulation of astrocyte morphology by inflammatory and anti-inflammatory stimuli.

Introduction

Reactive astrogliosis involves several processes that astrocytes undergo under pathological conditions^{1–4}. The alterations suffered by reactive astrocytes vary with the nature and severity of the insult. Modest metabolic stimulus, infections, inflammatory processes or mild trauma induce moderate reactive astrogliosis characterized by changes in the molecular expression of pro-inflammatory cytokines together with cellular hypertrophy. However, in severe central nervous system (CNS) injury models, astrogliosis also involves cell proliferation and scar formation³.

Astrocytic hypertrophy of reactive astrocytes is characterized by an increase in the number, thickness, and length of the main cellular processes, which also present a greater content in GFAP bundles than in nonreactive

astrocytes⁵. Although hypertrophy of astrocytes has been profusely studied, the signaling mechanisms that regulate morphological aspects of reactive astrogliosis remain unclear.

Notch1 receptor and ligands, Delta-like-1 (Dll-1) and Jagged-1 (Jag-1), have been extensively studied in relation with cell fate specification of neurons^{6–8}, vascular smooth muscle cells⁹, pancreatic endocrine cells¹⁰, and astrocytes^{11,12}. In addition, Notch signaling regulates the expression of molecules involved in the regulation of cell morphology in developing neurons^{13,14}. The canonical trans-activation of the Notch pathway starts with the binding of the extracellular domain of the ligand to the extracellular domain of the receptor expressed in an adjacent cell. This allows a conformational change in the receptor that favors its cleavage by metalloproteases and by the enzymatic complex γ-secretase, resulting in the release of the intracellular domain of Notch (NICD), the active fragment of the receptor. NICD is then translocated into the cell nucleus, where it initiates the transcription of Notch target genes, mainly hairy and enhancer of split (HES)-1 and 5^{6,15}, the main effectors of the pathway in the CNS¹⁶. Hes-1 and Hes-5 play a crucial role in

Correspondence: Maria-Angeles Arevalo (arevalo@cajal.csic.es)

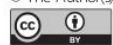
¹Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

²CIBER de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article.

These authors contributed equally: Estefania Acáz-Fonseca, Ana Ortiz-Rodríguez. Edited by N. Barlev

© The Author(s) 2019



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Developmental Sex Differences in the Metabolism of Cardiolipin in Mouse Cerebral Cortex Mitochondria

Received: 27 October 2016

Accepted: 25 January 2017

Published: 06 March 2017

Estefanía Acáz-Fonseca¹, Ana Ortiz-Rodríguez¹, Ana B. Lopez-Rodríguez¹, Luis M. Garcia-Segura¹ & Mariana Astiz^{1,2}

Cardiolipin (CL) is a mitochondrial-specific phospholipid. CL content and acyl chain composition are crucial for energy production. Given that estradiol induces CL synthesis in neurons, we aimed to assess CL metabolism in the cerebral cortex (CC) of male and female mice during early postnatal life, when sex steroids induce sex-dimorphic maturation of the brain. Despite the fact that total amount of CL was similar, its fatty acid composition differed between males and females at birth. In males, CL was more mature (lower saturation ratio) and the expression of the enzymes involved in synthetic and remodeling pathways was higher, compared to females. Importantly, the sex differences found in CL metabolism were due to the testosterone peak that male mice experience perinatally. These changes were associated with a higher expression of UCP-2 and its activators in the CC of males. Overall, our results suggest that the perinatal testosterone surge in male mice regulates CL biosynthesis and remodeling in the CC, inducing a sex-dimorphic fatty acid composition. In male's CC, CL is more susceptible to peroxidation, likely explaining the testosterone-dependent induction of neuroprotective molecules such as UCP-2. These differences may account for the sex-dependent mitochondrial susceptibility after perinatal hypoxia/ischemia.

Cardiolipin (CL) is a unique phospholipid that is almost exclusively localized at the inner mitochondrial membrane (IMM). CL is structurally unique from other glycerophospholipids since it contains four, rather than two, fatty acyl side chains. CL plays a relevant role in mitochondrial function, which is now appreciated to be multifaceted. CL content and fatty acid (FA) composition determine membrane fluidity and, therefore, affect the assembly of protein complexes^{1,2}. CL contributes to the stabilization of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) machinery and uncoupling proteins (such as UCP-2), increasing the efficiency of ATP synthesis^{3–8}. Moreover, CL stabilizes mitochondrial outer membrane translocators (translocase of the outer membrane, TOM and sorting and assembly machinery, SAM)⁹, regulates apoptosis by serving as a recruitment platform for caspase 8 downstream of Fas receptor signaling and is involved in cytochrome C release upstream of caspase 3^{10,11}. CL is also involved in mitochondrial fission/fusion processes^{12,13}, as well as in the initiation of mitophagy^{14,15}. Thus, alterations in CL structure, content, and acyl chain composition have been associated with mitochondrial dysfunction in multiple tissues in several physiopathological conditions¹⁶.

CL synthesis occurs entirely in the mitochondria. Phosphatidylglycerolphosphate synthase (PGS-1) catalyzes the first step in CL biosynthesis, transforming cytidine diphosphate (CDP)-diacylglycerol (CDP-DAG) in the short-lived phosphatidylglycerolphosphate (PGP), which is then desphosphorylated. CL synthase (CLS) generates immature CL from phosphatidylglycerol and another molecule of CDP-DAG. Immature CL is characterized by a random assortment of its acyl chains, which are mainly saturated and variable in length. An acyl chain remodeling process, which is typically defined by the incorporation of longer and unsaturated fatty acyl chains, is responsible for the molecular composition of mature cardiolipin¹⁷. This remodeling process is initiated by a phospholipase, in mammals the calcium-independent iPLA2- γ ¹⁸, which removes an acyl chain from cardiolipin, generating monolysocardiolipin (MLCL). Taffazin (Taz) then reacylates MLCL, by exchanging an acyl chain from

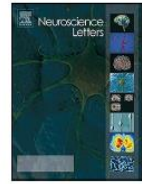
¹Instituto Cajal-CSIC. Avenida Doctor Arce 37, 28002 Madrid, Spain. ²Biochemistry Research Institute of La Plata (INIBIOLP), CONICET. 60 and 120, 1900, La Plata, Argentina. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.A.-F. (email: estefania.acaz@cajal.csic.es) or M.A. (email: marianaastiz@gmail.com)



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet



Research article

4'-Chlorodiazepam modulates the development of primary hippocampal neurons in a sex-dependent manner



B.D. Arbo^{a,b,*}, C. Vieira-Marques^{a,b}, I. Ruiz-Palmero^b, A. Ortiz-Rodriguez^b, M.A. Arevalo^b, L.M. Garcia-Segura^b, M.F. Ribeiro^a

^a Laboratório de Interação Neuro-Humoral, Department of Physiology, ICBS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite, 500 (90050-170), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Instituto Cajal, CSIC, Avenida Doctor Arce, 37 (28002), Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- TSPO ligands have been used as neurotherapeutic agents in different models.
- TSPO ligands effects on neuronal development are not known.
- 4'-CD developmental effects in male and female hippocampal neurons were evaluated.
- There were sex-differences in the development of male and female hippocampal neurons.
- 4'-CD stimulated the development of male, but not from female hippocampal neurons.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 November 2016

Received in revised form

16 December 2016

Accepted 27 December 2016

Available online 29 December 2016

Keywords:

Translocator protein (TSPO)

Sex differences

Steroids

Steroidogenesis

Neuritogenesis

Neuronal morphology

ABSTRACT

The translocator protein 18 kDa (TSPO) is located in the outer mitochondrial membrane and is involved in the cholesterol transport into the mitochondria and in the regulation of steroidogenesis and other mitochondrial functions. It is known that steroid hormones, such as estradiol, testosterone and dihydrotestosterone are neuroprotective and regulate neuritogenesis in the CNS by different mechanisms. However, the developmental effects of TSPO ligands in the CNS are not known. Therefore, the aim of this study was to identify the developmental effects of 4'-chlorodiazepam (4'-CD), a TSPO ligand, in primary cultures of male and female mouse hippocampal neurons. We observed that female neurons showed an advanced neuritogenesis compared to male neurons after 2 days *in vitro*. Moreover, it was shown that 4'-CD administration accelerated the maturation of male hippocampal neurons, without changing the development of female neurons. These findings, showing that 4'-CD modulates the development of hippocampal neurons in a sex-dependent manner, suggest that TSPO may be involved in the regulation of neuritogenesis.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Oestradiol synthesized by female neurons generates sex differences in neuritogenesis

Received: 30 October 2015

Accepted: 29 July 2016

Published: 24 August 2016

Isabel Ruiz-Palmero¹, Ana Ortiz-Rodriguez¹, Roberto Cosimo Melcangi², Donatella Caruso², Luis M. Garcia-Segura¹, Gabriele M. Rune³ & Maria-Angeles Arevalo¹

Testosterone produced by the foetal testis is converted by male neurons to oestradiol, which masculinizes neuronal morphology. Female neurons are known to synthesize oestradiol in absence of exogenous testosterone. However, the role of neuronal oestradiol on the differentiation of foetal female neurons is unknown. Here we show that, due to endogenous neuronal oestradiol synthesis, female hippocampal neurons have higher expression of the neurotogenic protein Neurogenin 3 and enhanced neuritogenesis than males. Exogenous application of testosterone or its metabolite dihydrotestosterone increases Neurogenin 3 expression and promotes neuritogenesis in males, but reduces these parameters in females. Together our data indicate that gonadal-independent oestradiol synthesis by female neurons participates in the generation of sex differences in hippocampal neuronal development.

The brain is a target for sex steroid hormones, such as testosterone and oestradiol, which are synthesized in the gonads and transported to the brain via circulation. In the male brain, testosterone produced by the foetal testis is converted in oestradiol, which regulates several aspects of neuronal development, including neuritogenesis^{1,2}, essential for the adequate generation of functional neuronal circuits. In addition, the brain is a steroidogenic tissue and expresses the steroidogenic molecules and enzymes necessary for the formation of testosterone from cholesterol³. In turn testosterone is metabolized within the brain in oestradiol by aromatase and in dihydrotestosterone (DHT) by 5 α -reductase³.

Brain sex differentiation in rodents depends on a peak in testosterone production by the foetal testis at embryonic days 17–18^{4,5}. The masculinising effects of testosterone in the brain are mediated by its metabolites oestradiol and DHT^{2,6}. While the role of testicular testosterone in brain sex differentiation has been extensively studied, little is known on the role of endogenous brain steroid synthesis in this process. Previous studies have shown that the development of hypothalamic and mesencephalic neurons in primary cultures is sexually dimorphic^{7,8–11}. In hypothalamic cultures, prepared before the peak of testosterone production by the foetal testis, female neurons develop faster than male neurons and this is associated with a higher expression of the neurotogenic factor Neurogenin 3 (Ngn3; Neurog3) in female neurons⁷. In this study, we have explored the expression of Ngn3 and neuritogenesis in primary mouse hippocampal cultures of male and female embryos in order to determine potential sex differences resulting from the effects of endogenous steroid synthesis.

Results

Sex differences in neuritogenesis. Based upon previous studies by Scerbo *et al.*⁷, who demonstrated sex-dependent neuritogenesis in primary hypothalamic neurons, we explored, as a first step, whether this is also the case in primary hippocampal neurons. After two days *in vitro* (DIV), hippocampal neurons displayed a sex-dependent degree of differentiation (Fig. 1). In cultures from males, 42.00 \pm 3.62% of the cells were devoid of any neuronal process (Stage I) and 34.00 \pm 2.55% of the cells showed neurites, but not a differentiated axon (Stage II). Only 14.75 \pm 4.01% of the cells in female cultures were in Stage I (Student's t-test, $p = 0.002$ vs male values), while 58.75 \pm 3.01% of the cells were already in Stage II ($p < 0.001$ vs male values). The proportion of the cells showing

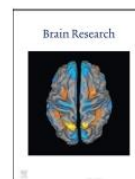
¹Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avenida Doctor Arce 37, 28002 Madrid, Spain.

²Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Center of Excellence on Neurodegenerative Diseases, Università degli Studi di Milano, Via G. Balzarotti 9, 20133 Milan, Italy. ³Institute of Neuroanatomy, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.M.G.-S. (email: lmg@s@cajal.csic.es)



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/brainres

Research Report

Dehydroepiandrosterone protects male and female hippocampal neurons and neuroblastoma cells from glucose deprivation



Claudia Vieira-Marques^{a,b,*}, Bruno Dutra Arbo^{a,b}, Isabel Ruiz-Palmero^b,
Ana Ortiz-Rodriguez^b, Samar Ghorbanpoor^b, Luiz Carlos Kucharski^a, Maria A. Arevalo^b,
Luis Miguel Garcia-Segura^b, Maria Flávia M. Ribeiro^a

^a Laboratório de Interação Neuro-Humoral, Department of Physiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Instituto Cajal, CSIC, Avenida Doctor Arce, 37, 28002 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 December 2015

Received in revised form

28 April 2016

Accepted 8 May 2016

Available online 9 May 2016

Keywords:

DHEA

Neurodegenerative diseases

Ischemia

Apoptosis

Neuroprotection

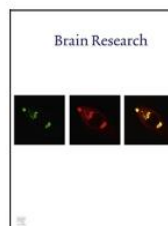
ABSTRACT

Dehydroepiandrosterone (DHEA) modulates neurogenesis, neuronal function, neuronal survival and metabolism, enhancing mitochondrial oxidative capacity. Glucose deprivation and hypometabolism have been implicated in the mechanisms that mediate neuronal damage in neurological disorders, and some studies have shown that these mechanisms are sexually dimorphic. It was also demonstrated that DHEA is able to attenuate the hypometabolism that is related to some neurodegenerative diseases, eliciting neuroprotective effects in different experimental models of neurodegeneration. The aim of this study was to evaluate the effect of DHEA on the viability of male and female hippocampal neurons and SH-SY5Y neuroblastoma cells exposed to glucose deprivation. It was observed that after 12 h of pre-treatment, DHEA was able to protect SH-SY5Y cells from glucose deprivation for 6 h (DHEA 10^{-12} , 10^{-8} and 10^{-6} M) and 8 h (DHEA 10^{-8} M). In contrast, DHEA was not neuroprotective against glucose deprivation for 12 or 24 h. DHEA (10^{-8} M) also protected SH-SY5Y cells when added together or even 1 h after the beginning of glucose deprivation (6 h). Furthermore, DHEA (10^{-8} M) also protected primary neurons from both sexes against glucose deprivation. In summary, our findings indicate that DHEA is neuroprotective against glucose deprivation in human neuroblastoma cells and in male and female mouse hippocampal neurons. These results suggest that DHEA could be a promising candidate to be used in clinical studies aiming to reduce neuronal damage in people from both sexes.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Research Report

4'-Chlorodiazepam is neuroprotective against amyloid-beta through the modulation of survivin and bax protein expression in vitro



B.D. Arbo^{a,b,*}, C.V. Marques^{a,b}, I. Ruiz-Palmero^b, A. Ortiz-Rodriguez^b,
S. Ghorbanpoor^b, M.A. Arevalo^b, L.M. Garcia-Segura^b, M.F. Ribeiro^a

^aLaboratório de Interação Neuro-Humoral, Department of Physiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

^bInstituto Cajal – CSIC, Avenida Doctor Arce, 37, 28002 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 11 December 2015

Available online 18 December 2015

Keywords:

Translocator protein (TSPO)

Steroids

Steroidogenesis

Apoptosis

Alzheimer's disease

ABSTRACT

The translocator protein of 18 kDa (TSPO) is located in the outer mitochondrial membrane and is involved in the cholesterol transport into the mitochondria and in the regulation of steroidogenesis, mitochondrial permeability transition pore opening and apoptosis. TSPO ligands have been investigated as therapeutic agents that promote neuroprotective effects in experimental models of brain injury and neurodegenerative diseases. The aim of this study was to identify the neuroprotective effects of 4'-chlorodiazepam (4'-CD), a ligand of TSPO, against amyloid-beta ($A\beta$) in SHSY-5Y neuroblastoma cells and its mechanisms of action. $A\beta$ decreased the viability of SHSY-5Y neuroblastoma cells, while 4'-CD had a neuroprotective effect at the doses of 1 nM and 10 nM. The neuroprotective effects of 4'-CD against $A\beta$ were associated with the inhibition of $A\beta$ -induced upregulation of Bax and downregulation of survivin. In summary, our findings indicate that 4'-CD is neuroprotective against $A\beta$ -induced neurotoxicity by a mechanism that may involve the regulation of Bax and survivin expression.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.