



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

# “Estrés oxidativo en astrocitos corticales primarios durante el envejecimiento”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular

Constanza Rubio Torrealba

Director del Seminario de Título: Christian González Billault  
Codirector: Dasfne Lee Liu

Enero 2022  
Santiago-Chile



## **INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr(ta)**.

**Constanza Rubio Torrealba**

**“Estrés oxidativo en astrocitos corticales primarios durante el envejecimiento”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular.

**Dr. Christian González-Billault**

---

**Director Seminario de Título**

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Dr. Marco Tulio Núñez**

---

**Presidente Comisión**

**Dra. Daniela Sauma**

---

**Evaluador**

Santiago de Chile, enero 2023

## Índice de Contenidos

Índice de Contenidos .....	ii
Índice de Tablas .....	iv
Índice de Figuras .....	v
Listado de Abreviaturas .....	vi
Resumen .....	vii
Abstract .....	viii
Introducción .....	1
Envejecimiento .....	1
Astrocitos.....	3
Teoría de los Radicales Libres.....	4
Astrocitos y estrés Oxidativo en el envejecimiento.....	8
Hipótesis.....	12
Objetivo general .....	12
Objetivos específicos.....	12
Materiales y Métodos.....	13
Cultivo de astrocitos desde ratones adultos.....	13
Subcultivo o tripsinización.....	13
Fijación e inmunofluorescencia.....	14
Análisis de datos transcriptómicos.....	14
Búsqueda bibliográfica .....	15
Selección de genes que cambian en el envejecimiento relacionados con el metabolismo de ROS y curación manual.....	15
Análisis STRING, enriquecimiento de <i>Gene Ontology</i> y vías KEGG.....	19
Resultados.....	20
Caracterización de cultivos primarios de astrocitos de cortezas de ratones adultos ....	20
Análisis transcriptómico de proteínas relacionadas con el manejo de ROS durante el envejecimiento.....	28
Selección de genes que cambian durante el envejecimiento, análisis STRING y enriquecimiento de términos de Gene Ontology (GO) .....	29
Genes relacionados al metabolismo de especies reactivas de oxígeno.....	32

Análisis de modificaciones post traduccionales del tipo oxidativo en proteínas cuya expresión cambia durante el envejecimiento.....	39
Discusión .....	43
Caracterización de cultivos primarios de astrocitos de cortezas de ratones adultos ....	43
Análisis transcriptómico de proteínas relacionadas con el manejo de ROS durante el envejecimiento.....	45
Selección de genes que cambian durante el envejecimiento, análisis STRING y enriquecimiento de términos de Gene Ontology (GO) .....	46
Genes relacionados al metabolismo de especies reactivas de oxígeno.....	46
Análisis de modificaciones post traduccionales del tipo oxidativo en proteínas cuya expresión cambia durante el envejecimiento.....	48
Conclusiones .....	51
Bibliografía.....	52

## Índice de Tablas

Tabla 1. Términos <i>Gene Ontology</i> relacionados a especies reactivas de oxígeno.....	18
Tabla 2. Investigaciones encontradas que cumplen con los parámetros de búsqueda de cambios de expresión génica durante el envejecimiento en astrocitos. En los rangos etarios, P significa días postnatal; m meses y a años, .....	28
Tabla 3. Número de genes en las listas de transcriptómicas obtenidas a partir del estudio de Boisvert et al 2018.....	30
Tabla 4. Número de genes en las listas de transcriptómicas obtenidas a partir del estudio de Clarke et al 2018. ....	30
Tabla 5. Número de genes obtenidos de cada base de datos de transcriptómicas según los filtros que se van aplicando. ....	31
Tabla 6. Genes que cambian con el envejecimiento y relacionados al metabolismo de ROS (genes DERR) en distintas transcriptómicas. ....	32
Tabla 7. Categorías de genes que cambian durante el envejecimiento relacionados con especies reactivas de oxígeno.....	33
Tabla 8 Genes que cambian durante el envejecimiento directamente relacionados al metabolismo de ROS (DRMR).....	35
Tabla 9. Sitios únicos asociados a proteínas de los genes DERR. ....	40
Tabla 10. Sitios compuestos asociados a proteínas de los genes DERR. ....	41

## Índice de Figuras

Figura 1. Visión general del flujo de trabajo utilizado para obtener y trabajar con los datos de las diferentes transcriptómicas. ....	15
Figura 2. Fotografías en microscopio óptico del crecimiento del cultivo primario de astrocitos proveniente de cortezas de ratones adultos de 11 meses de edad a 20X de magnificación.....	21
Figura 3. Microscopía de inmunofluorescencia de dos réplicas biológicas de cultivos de astrocitos de 70 DIV provenientes de cortezas de ratones de 11 meses de edad.....	23
Figura 4. Inmunofluorescencia de cultivo de cortezas de ratones jóvenes (6 meses de edad) y jóvenes envejecidos (24 meses de edad) en dos magnificaciones distintas, usando marcadores de tipo celular. ....	25
Figura 5. Inmunofluorescencia de cultivo de cortezas de ratones jóvenes (6 meses de edad) y jóvenes envejecidos (24 meses de edad) en dos magnificaciones distintas, usando marcadores de tipo celular. ....	27
Figura 6. Redes STRING de genes que cambian en el envejecimiento que están relacionados con especies reactivas de oxígeno. ....	34
Figura 7. Análisis de enriquecimiento de términos de Gene Ontology. ....	36
Figura 8. Rutas KEGG de genes que cambian durante el envejecimiento relacionados directamente con el metabolismo de especies reactivas de oxígeno. ....	38
Figura 9. Cambio en el estado oxidativo de cisteínas de proteínas de genes DRMR...	42

## Listado de Abreviaturas

Aldh111: del inglés *Aldehyde Deshydrogenase 1 family member L1*, o miembro L1 de la familia aldehído deshidrogenasa.

DAVID: del inglés *Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery*, o Base de datos para Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado.

DERR: genes Diferenciales en el Envejecimiento Relacionados a ROS

DRMR: genes Directamente Relacionados con el Metabolismo de ROS

GFAP: del inglés *Glial fibrillary acidic protein* o Proteína Ácida Fibrilar Glial

GO: del inglés *Gene Ontology*, u Ontología de Genes

KEGG: del inglés *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, o Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas

Ndufs1: del inglés *NADH Ubiquinone oxidoreductase core subunit S1*, o subunidad S1 central óxido-reductasa ubiquinona de NADH

OMS: Organización Mundial de la Salud

Prdx1: del inglés, *Peroxiredoxin-1*, o Peroxiredoxina 1

REDOX: Reducción - Oxidación

ROS: del inglés *Reactive Oxygen Species*, o Especies Reactivas de Oxígeno.

STRING: del inglés *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*, o Herramienta de Búsqueda para la Recuperación de Interacción de Genes/proteínas

## Resumen

El envejecimiento es el proceso en el cual con el tiempo disminuye el funcionamiento óptimo fisiológico. Las neuronas son células de metabolismo principalmente oxidativo, y que, en junto a los astrocitos, puede contrarrestar las especies reactivas de oxígeno derivadas de esta actividad. Los astrocitos son un tipo celular de soporte neuronal, con vías antioxidantes que permiten mantener un tono REDOX adecuado. Hay evidencia de cambios en la expresión de proteínas antioxidantes en astrocitos envejecidos, pero estas investigaciones fallan en encontrar un modelo de estudio que represente de forma fidedigna el envejecimiento, dada la dificultad de cultivar astrocitos adultos. En este seminario de título, se estableció en el laboratorio un protocolo de cultivo primario de astrocitos corticales de ratones adultos jóvenes y viejos, con el cual se tiene un modelo que refleja de fidedignamente el envejecimiento. Por otro lado, a fin de entender la respuesta REDOX en astrocitos envejecidos, se integraron 4 transcriptomas de astrocitos de ratones envejecidos, enfocándose en la expresión de proteínas que cambien durante el envejecimiento y que estuviesen relacionadas con el metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS). A través de enriquecimiento de Ontología de Genes, análisis de vías KEGG y redes STRING se encontró que existen cambios en vías de metabolismo de glucosa, inflamación y proliferación celular. También, al cruzar estos datos con la base de datos de oxidación del proteoma del ratón envejecido (*Oximouse*), se encontró que *Ndufs1*, es la proteína con mayor número de sitios con cambios en el porcentaje de oxidación, y que *Prdx1*, es la proteína que tiene el mayor cambio de porcentaje de oxidación, lo que puede cambiar la actividad de ambas. Esto muestra que en el envejecimiento hay cambios específicos en la expresión y modificación de proteínas del metabolismo de ROS, pudiendo alterar la homeostasis REDOX y fisiología de los astrocitos.

## **Abstract**

Aging is the process in which optimal fitness declines over time. Neurons are cells with a primarily oxidative metabolism and together with astrocytes, counteract the reactive oxygen species (ROS) by-products. Astrocytes are a cell type of neuronal support, with antioxidant pathways that contribute to maintaining neuronal REDOX tone. There is evidence of changes in the expression of antioxidant proteins in aged astrocytes, but these studies fail to find a study model that accurately represents aging, given the difficulty of culturing astrocytes from adult animals. In this seminar, a cortical astrocyte primary culture protocol from young and old adult mice was successfully established in our laboratory. Furthermore, to understand astrocyte's REDOX metabolism in aging, we integrated 4 aged mouse transcriptomes, focusing on astrocyte's aging expression changes related to the metabolism of reactive oxygen species (ROS). Through gene ontology enrichment. (GO enrichment), analysis of KEGG pathways and STRING networks, we found changes in glucose metabolism, inflammatory and cell proliferation pathways. Also, crossing these data with the database of cysteine oxidation of the mouse proteome during aging (*Oximouse*), revealed that *Ndufs1*, is the protein with most sites number with oxidation percentage changes during aging, and that *Prdx1*, is the protein with the greatest change in oxidation percentage in aging. This show that in aging, there is specific changes in the expression and modification of ROS metabolism related proteins, that could impair REDOX homeostasis and astrocyte physiology.

## **Introducción**

### Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso en el cual, el paso del tiempo cambia gradualmente el funcionamiento óptimo de la fisiología de la gran mayoría de seres vivos (López-Otín *et al.*, 2013; Steenman y Lande, 2017). Por la gran variación entre individuos en este proceso, es complejo realizar una definición precisa (Balcombe y Sinclair, 2001), por lo que en términos generales se asocia a un conjunto de manifestaciones muy comunes, como por ejemplo, pérdida gradual de la visión, de la audición o disminución de la movilidad. Estos cambios revelan funcionalmente los detrimentos que ocurren en la salud de una persona al envejecer o lo llamado como pérdida del *fitness* fisiológico.

Según la OMS, para el año 2050 sobre el 20% de la población mundial tendrá más de 60 años, esto es, 424 millones de personas, de las cuales el 80% vivirán en países de ingreso bajo y medio (Anon., 2020). En Chile, según el informe de las Naciones Unidas (Nations, 2019), para el año 2050 la población mayor de 65 años ascenderá por sobre los 5 millones de habitantes, equivalente al 25% de la población total. El envejecimiento de la población viene acompañado del incremento de las principales enfermedades no transmisibles que aquejarán a las personas, y, por lo tanto, en la inversión que como sociedad debe destinar para el tratamiento de estas enfermedades. En Chile, se estimó que el gasto público en salud en adultos mayores en el año 2002 fue de \$497.620 miles de millones, lo que representa el 17,3% del gasto total en salud y un 1% del PIB nacional de ese año (Olivares-Tirado y Salazar B, 2006).

En términos epidemiológicos, las patologías más comunes en las personas adultos mayores son las enfermedades cardiovasculares, hipertensión, cáncer, diabetes y

osteoartritis (Jaul y Barron, 2017; Franceschi *et al.*, 2018) entre otras, cuyas causas están en constante investigación, pero que están íntimamente relacionadas con cambios celulares y moleculares. Todos estos, conforman los distintos detrimentos fisiológicos en los individuos y que pueden alterar progresivamente la calidad de vida de las personas.

Otro aspecto importante que ocurre durante un envejecimiento normal, es el deterioro cognitivo, el cual se manifiesta en su mayoría como dificultades para aprender, memorizar, estar atento, o problemas de coordinación motora (Murman, 2015; Mattson y Arumugam, 2018), y que va acentuándose de forma diferencial entre las personas, dependiendo varios factores tanto genéticos, como ambientales y socio-culturales (World Health Organization 2020). Dentro de las enfermedades del envejecimiento que afectan las funciones cognitivas, se encuentra sus mayores representantes: el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. La primera es una enfermedad de amplia prevalencia, en Chile hay un 8,2% de prevalencia en personas adultos mayores de 65 años y un 32% en adultos sobre los 85 años (Minsal, 2014). Por otro lado, se estima que alrededor del 80% de las personas con Parkinson en Chile son personas adultos mayores (Minsal, 2014), siendo ambas enfermedades de un alto costo social, dado el impacto que tiene para las familias tanto económicamente como emocionalmente.

El envejecimiento se caracteriza por una disminución de la materia gris y blanca, junto a un aumento del tamaño de los ventrículos cerebrales. A nivel celular y molecular se relaciona con una serie de eventos o cambios que en su conjunto se han denominado los *pilares del cerebro envejecido*, algunos de los cuales son disfunción mitocondrial, aumento del daño oxidativo, dificultad en la respuesta adaptativa al estrés, disminución de la capacidad de eliminación de desechos moleculares, de las neuronas, activación

de la células gliales e inflamación, entre otros (Mattson y Arumugam, 2018). Todos estos cambios se ven exacerbados en enfermedades del envejecimiento, por lo que estudiar estos fenómenos es clave para entender la progresión de este grupo de patologías.

### Astroцитos

En el cerebro, aproximadamente el 50% de las células son glía (Herculano-Houzel, 2014), entre los cuales se encuentran la microglía, los oligodendrocitos, y los astroцитos. La microglía es un tipo celular inmunocompetente y fagocítico; los oligodendrocitos, producen mielina que permite una conducción saltatoria rápida en los axones, entre otras funciones (Jäkel y Dimou, 2017). Los astroцитos, poseen variadas funciones dentro del sistema nervioso central (SNC), tales como ser parte de la barrera hematoencefálica, la cual mantiene una composición iónica y proteica óptima en el cerebro; proteger de sustancias neurotóxicas que estén en la sangre; y asegurar un suministro adecuado de nutrientes (Abbott *et al.*, 2010). En este último punto, los astroцитos tienen una participación directa en suplir los requerimientos energéticos del cerebro, abasteciendo de lactato a las neuronas, las cuales posteriormente pueden usarla en la fosforilación oxidativa, proceso llamado lanzadera de lactato astrocito-neurona. Los astroцитos también son parte de la llamada sinapsis tripartita, en la cual los procesos peri- sinápticos o “pies terminales” pueden modular la estabilización, maduración y eliminación de las espinas dendríticas, además de participar de la modulación de la transmisión y plasticidad sináptica (Liu *et al.*, 2018), dado por la capacidad del astrocito de secretar componentes de la compleja matriz extracelular de la sinapsis (Faissner *et al.*, 2010). Asimismo, también contribuye con el intercambio de

un precursor de glutatión, GSH y de cisteína al espacio extracelular que son captados por la neurona para la biosíntesis de glutatión.

Por otro lado, los astrocitos funcionan como sensores de señales metabólicas y endocrinas pudiendo detectar niveles de oxígeno, glucosa, pH, CO<sub>2</sub> y hormonas relacionadas con el metabolismo energético, apetito y saciedad (Marina *et al.*, 2018), además de sensor el flujo sanguíneo, participando en la vasoconstricción y vasodilatación (Attwell *et al.*, 2010) en el cerebro.

Otra función importante para considerar es que las neuronas al tener un metabolismo energético basado principalmente en la fosforilación oxidativa producen una gran cantidad de ROS y RNS (del inglés, *reactive oxygen species* y *reactive nitrogen species*, respectivamente). Ante esto, los astrocitos tienen la capacidad de activar y mantener una maquinaria antioxidante controlada por el factor de transcripción Nrf2 que permite la expresión de genes que codifican para la superóxido dismutasa 1 (SOD1, citosólica), superóxido dismutasa 2 (SOD2, mitocondrial), NAD(P)H quinona oxidoreductosa (NQO1), las cuales transforman superóxido en peróxido de hidrógeno (Fernandez-Fernandez, Almeida y Bolaños, 2012), en conjunto con la enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y tiorredoxina.

#### Teoría de los Radicales Libres

Esta teoría, propuesta en los años 50', postula que el envejecimiento y enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento son atribuibles a la acumulación y ataques deletéreos de especies reactivas de oxígeno producto del metabolismo normal (Pomatto y Davies, 2018) a componentes celulares como lípidos, ADN y proteínas (Mu y Chen, 2020). Esta teoría implica que: 1) los niveles de biomoléculas dañadas por ROS aumentan con la edad; 2) manipulaciones de la dieta, farmacológicas o genéticas

que aumentan la sobrevida del envejecimiento, reducirían el daño oxidativo de biomoléculas; y 3) disminuir los niveles de estrés oxidativo, retardarían el envejecimiento y aumentarían la sobrevida. Todo esto considera que lo que determina el nivel absoluto de estrés oxidativo son tanto las vías productoras de ROS, como aquellas que degradan o secuestran los ROS, es decir, los antioxidantes (Pomatto y Davies, 2018).

Hay evidencia que avala esta teoría; por ejemplo, el aumento del daño oxidativo es asociado al acortamiento de telómeros (Kawanishi, Hiraku y Oikawa, 2001) (un indicador de envejecimiento celular); también, en roedores envejecidos, hay aumento en una lesión clásica del ADN llamada 8-Oxo2-deoxyguanosine (o 8oxo-dG), producto de la oxidación de las guanosinas en la secuencia genética, pudiendo generar mutaciones y cambios epigenéticos (Hamilton *et al.*, 2001; Johnson y Stolzing, 2019). Éste efecto se ha visto exacerbado en cerebros de pacientes con Alzheimer (Bokov, Chaudhuri y Richardson, 2004). En adición, el mayor productor de ROS en la célula, la mitocondria, sufre una gran pérdida de su ADN durante el envejecimiento, especialmente en tejidos post-mitóticos como músculo y cerebro, generando mayor cantidad de mutaciones, las que están sobre representadas en personas con Alzheimer (Mandavilli, Santos y Van Houten, 2002). Finalmente, otra evidencia a favor de esta teoría, es que se ha visto que aumentar la disponibilidad de NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, un sustrato de varios sistemas antioxidantes), en ratones, eleva la expectativa de vida significativamente (Nóbrega-Pereira *et al.*, 2016).

En contraparte, diversos estudios que modifican la expresión de antioxidantes han mostrado resultados que no concuerdan con esta teoría. Por ejemplo, estudios en que

se aumenta la expresión de antioxidantes como la superóxido dismutasa 1 (SOD1), 2 (SOD2), glutatión peroxidasa 4 (GPx4) y catalasa, cada uno individualmente, o más de uno a la vez, no han aumentado la supervivencia de ratones o incluso la han disminuido (Pomatto y Davies, 2018). Estos resultados apuntan que los ROS no son sólo moléculas dañinas y los antioxidantes parte de un sistema protector pero insuficiente, que genera los detrimentos en el envejecimiento, sino que se trata de un balance de oxido-reducción (REDOX) complejo, con numerosas vías que dan adaptabilidad a los cambios celulares.

Apoyando esto, algunas especies reactivas de oxígeno han demostrado ser componentes de vías de señalización en los seres vivos, con una marcada localización sub-celular. Este ocurre gracias a que algunas ROS, como el peróxido de hidrógeno, provocan cambios reversibles en proteínas (o modificaciones postraduccionales), como oxidación en residuos de cisteína, a su forma sulfénica (-SOH), impidiendo que ésta forme enlaces disulfuro, que alteran la función de la proteína (Schieber y Chandel, 2014). Este cambio puede ser revertido por proteínas antioxidantes como la tioredoxina y glutaredoxina. Sin embargo, en concentraciones altas (sobre la escala nano molar), la cisteína se puede oxidar a una forma sulfínica (-SO<sub>2</sub>H) o sulfónica (-SO<sub>3</sub>H) en un proceso irreversible, resultando en un daño permanente, lo que puede ocurrir en condiciones fisiológicas extremas (Lyublinskaya y Antunes, 2019).

Se ha visto que dentro de niveles fisiológicos de peróxido de hidrógeno intracelular (1 – 10 nM (Sies, 2017a; Lyublinskaya y Antunes, 2019), éste puede iniciar distintas vías de señalización, como el caso de ASK1 (quinasa 2 de apoptosis regulada por señal). Esta proteína, en presencia de peróxido de hidrógeno, se disocia de su supresor, e inicia la cascada de señalización de diferenciación celular a través de p38 y JNK (quinasas N-

terminal c-Jun) (Ray, Huang y Tsuji, 2012). Por otro lado, el peróxido puede inactivar a PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina), lo que permitirá el aumento de PIP3 (fosfatidilinositol trifosfato), permitiendo la cascada de señalización de la vía PI3K (fosfoinositol 3 quinasa), que permite una respuesta de proliferación y supervivencia celular (Cantley, 2002; Ray, Huang y Tsuji, 2012). También, se ha encontrado que las ROS participan en las vías de señalización iniciadas por los receptores Toll-like (TLR) en el sistema inmune innato, promoviendo la secreción de citoquinas inflamatorias (West *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta que el cerebro ocupa un 20% del oxígeno total del cuerpo (Rink y Khanna, 2011), es de esperar que en este órgano las especies reactivas de oxígeno estén mantenidas en un estricto balance que permita evitar tanto el estrés oxidativo, como mantener funcionales las vías de señalización redox dependientes. Por ejemplo, proteínas del citoesqueleto, como la actina y filamentos intermedios poseen residuos susceptibles a oxidación afectando la dinámica de estos, es decir, su polimerización y despolimerización, lo que incide en numerosos procesos celulares en el sistema nervioso (Wilson y González-Billault, 2015). Entre estos, por ejemplo, está el proceso de polarización neuronal, en el cual este tipo celular adquiere su morfología característica y funcionalidad. Proteínas como las semaforinas provocan un aumento de peróxido de hidrógeno, lo que activa una vía de señalización de los conos de crecimiento neuronal (Morinaka *et al.*, 2011). Incluso se ha visto que la oxidación por peróxido puede afectar a proteínas del citoesqueleto, como es el caso de la actina, en la cual se ha observado que la oxidación de residuos específicos lleva a la despolimerización de ésta, actuando así como regulador de la polarización neuronal (Oswald *et al.*, 2018; Varland, Vandekerckhove y Drazic, 2019).

En este contexto, la polarización neuronal mediada por ROS fue previamente estudiada en nuestro laboratorio, en donde se encontró que, la producción de ROS por el complejo NADPH-2 oxidasa o NOX2, permite el desarrollo del axón y la polarización de neuronas hipocámpales, gracias a que las ROS estimulan la apertura de canales de calcio del retículo endoplasmático RyR, que luego activa la proteína Rac1 y, que está relacionada directamente con la elongación del axón (Wilson *et al.*, 2016).

#### Astroцитos y estrés Oxidativo en el envejecimiento

Como se mencionó anteriormente, se ha visto que en el envejecimiento existe un aumento del estrés oxidativo generalizado en el organismo, incluyendo los astroцитos (Brawek *et al.*, 2010; Pomatto y Davies, 2018). Los astroцитos de ratones de mediana edad que están sometidos a compuestos oxidantes tienen una menor capacidad de contrarrestarlo que los ratones jóvenes (Ishii *et al.*, 2017). Esto sugiere que la capacidad de los astroцитos de dar soporte antioxidante a las neuronas disminuye con la edad (Lin *et al.*, 2007). Pese a lo anterior, esto no significa que las vías no estén activas, si no, que el sistema antioxidante puede no estar dando abasto. Prueba de ello, son los modelos de distintas enfermedades neurodegenerativas donde se ha visto que hay una mayor proporción de Nrf2 (activador de las vías antioxidantes) activo en astroцитos en Parkinson, Alzheimer y esclerosis múltiple, enfermedades que son asociadas al envejecimiento (Kraft, Johnson y Johnson, 2004; Liddell, 2017). Todo lo anterior lleva al cuestionamiento de si estas vías antioxidantes están efectivamente activas, y si son insuficientes para una neuroprotección eficiente.

Actualmente existen estudios sobre cómo cambia la cantidad de peróxido de hidrógeno en modelos de astroцитos “envejecidos”, sin embargo, en cada uno de estos no se ha

logrado mostrar de forma fidedigna qué es lo que realmente ocurre en el envejecimiento.

En el estudio de Jiang E. & Cadenas E. (2014) se usaron ratas Sprague-Dawley machos de 7, 13 y 18 meses, a partir de los cuales se obtuvieron astrocitos corticales primarios con el fin de encontrar cambios en parámetros bioenergéticos y en la respuesta inflamatoria. Se encontró un aumento en el metabolismo energético mitocondrial, lo que debería desencadenar una mayor fuga de protones y mayor síntesis de NADPH oxidasas. Por esto, midieron la producción de peróxido de hidrógeno, observándose un aumento de este asociado a las enzimas NOX2 y NOX4. Sin embargo existen limitaciones en este estudio: la selección de las edades de las ratas, cuya expectativa de vida es de 3 años en promedio, corresponderían todos a etapas de la vida adulta y ninguna estaría dentro de lo que se consideraría “vejez” propiamente tal, donde incluso se ha comparado 18 meses de rata a 45 años en humanos (Sengupta, 2013). También, las mediciones de concentración de peróxido de hidrogeno se realizaron con el kit *Amplex Red/Peroxidase Assay* (Invitrogen) el cual sólo permite saber la concentración de este compuesto en el medio extracelular, y, por lo mismo, se desconoce cómo es en el medio intracelular, o si hay una distribución específica de peróxido dentro de la célula.

En el estudio de Bellaver et. al (2017), se usaron astrocitos hipocampales primarios de ratas Wistar machos de 1, 90 y 180 días con el fin de evaluar cambios funcionales relacionados con la edad, tales como senescencia, mantención del ciclo glutamato/glutamina y manejo del estrés oxidativo (Bellaver, Souza y Souza, 2017). Se evaluó la producción de ROS mediante el compuesto 2'-7'diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), usado comúnmente para medir peróxido de hidrógeno

intracelular, donde se encontró un aumento con la edad. Sin embargo, esta oxidación puede estar mediada tanto por peróxido de hidrógeno, como por el radical hidroxilo, peroxinitritos, radicales carbonatos, y la proteína citocromo c (Ji-Ann Lee, 2012). Por lo anterior, esta sonda es más bien un indicador *redox* que un medidor de peróxido de hidrógeno, con lo cual no se podrá saber cómo es el cambio específico de este señalizador a nivel intracelular. En este estudio se observa que los animales aún no alcanzan una edad verdaderamente envejecida (al menos desde los 20 meses en ratas (Sengupta, 2013)).

En el estudio de Pertusa M, et al. (2007), para la capacidad neuroprotectora de astrocitos en el envejecimiento, se usaron astrocitos corticales primarios provenientes de ratas Fisher 344 de 2 días de vida, los cuales fueron cultivados por 10 o 90 días, como modelo de envejecimiento *in vitro*. Los autores evaluaron también ROS intracelular con el compuesto DCFH-DA y también midieron por *western blot* el contenido de nitrotirosina (producto de oxidación de proteínas) en donde en ambos casos hubo un aumento del estado REDOX con el envejecimiento *in vitro* (Pertusa, Garcı y Rodrı, 2007). Considerando los cuestionamientos ya mencionados que conllevan la medición de ROS por DCFH-DA, el hecho es que el tipo de envejecimiento *in vitro* no ha pasado por los mismos procesos de un envejecimiento normal, donde diferentes tipos celulares interactúan y dándose sustento y señales de sobrevivencia entre sí.

Por último, en el estudio de T. Ishii *et al.* (2016), para evaluar los efectos del estrés oxidativo dependientes de la edad en el hipocampo, usaron un modelo de ratón transgénico con expresión ubica de un gen que aumentaba la fuga de electrones de la cadena transportadora de electrones, lo que aumentaría el estrés oxidativo en ratones

jóvenes (4-8 meses) y de mediana edad (10-14 meses). Entre los varios parámetros evaluados, se analizó los niveles totales de ROS intracelular en secciones histológicas de hipocampos completos y los niveles de ROS dentro de la mitocondria mediante Mito-SOX y DCFH-DA. En ambos tipos de mediciones no se encontró una relación notable entre la edad y la producción de ROS en los astrocitos de las distintas áreas del hipocampo (Ishii *et al.*, 2017). Cabe destacar que en este estudio se identificaron astrocitos sólo por la morfología celular desde estos cortes histológicos sin la utilización de marcadores célula específicos, lo que hace que su aproximación no sea del todo exacta.

Por todo lo anteriormente expuesto, los estudios que han intentado dar cuenta del cambio de la formación de peróxido de hidrógeno en astrocitos en el envejecimiento, lo han hecho a través de modelos que comparan animales que, ya sea no tienen edades consideradas dentro del rango envejecido, o usan modelos *in vitro* o transgénicos que no muestran de forma evidente lo que ocurre en este tipo celular durante el envejecimiento, usando métodos que no son específicos para el peróxido de hidrógeno, y mostrando un contexto redox intracelular general, que no reporta de forma directa si este señalizador está cambiando su concentración dentro de los astrocitos.

## Hipótesis

El envejecimiento induce cambios en la expresión y actividad de genes involucrados en la respuesta redox en astrocitos, generando cambios en la concentración intracelular de peróxido de hidrógeno.

## Objetivo general

Identificar genes expresados en el cerebro relacionados con el metabolismo de ROS que cambian durante el envejecimiento

## Objetivos específicos

1. Estandarizar y caracterizar cultivos primarios de astrocitos provenientes de corteza de ratones jóvenes, adultos y envejecidos.
2. Obtención y procesamiento de bases de datos de transcriptómicas de envejecimiento en cerebro, que incluyan astrocitos corticales
3. Encontrar genes, vías y procesos en las que estén involucrados, relacionados al metabolismo de ROS y envejecimiento.

## **Materiales y Métodos**

### Cultivo de astrocitos desde ratones adultos

Luego de la eutanasia del ratón, se decapitó y se extrajo el cerebro, manteniéndose en solución de HBSS (HBSS 1X, HEPES 10mM, penicilina 10 U/mL, estreptomicina 10µg/mL y antimicótico Fungizone® 250 ng/mL), en hielo todo el tiempo. En la disección, se removió cerebro medio, bulbo olfatorio, cerebelo, hipocampo y meninges, dejando solo las cortezas. En campana de cultivo, se retiró la solución de HBSS y agregó 2,5 mL de dispasa 1U/mL en DMEM/F12, con incubación de 10 minutos a 37°C. Luego de retirar la dispasa, se agregó 5 mL de medio DMEM/F12 20%FBS penicilina/estreptomicina y se disgregó de la siguiente manera: con la pipeta serológica de 10 mL se aspira y se expulsa el tejido 4 veces. Se espera a que decante, y luego el sobrenadante es filtrado por un filtro de células de 70 µm. Repetir con pipeta serológica de 10 mL y luego repetir 2 veces más con pipeta serológica de 5 mL. Los 20 mL colectados se disponen en frascos T-75 tratado previamente con solución de poli D-lisina 0,1 mg/mL, y dejar a 37°C en incubador con 3% O<sub>2</sub> y 10% CO<sub>2</sub> por 48 horas antes del primer cambio de medio. El medio, posteriormente, se cambió 2 veces a la semana hasta alcanzar los 70 días *in vitro* aproximadamente o que se alcance un 50% de confluencia.

### Subcultivo o tripsinización

Para remover las microglías, los frascos con los astrocitos fueron agitados en un agitador orbital por 4 horas, seguido de cambio de medio. Si luego de esto se observaban muchas microglías en el microscopio, se agita por 2 horas más. Luego de sacar el medio, se agregaron 4 mL de tripsina 0,5%, incubándose por 5 minutos en agitación. Se centrifugó a 300 g por 5 minutos, se recuperó y resuspendió el pellet para

posteriormente contar y plaquear a aproximadamente 20.000 células/cm<sup>2</sup> en cubreobjetos previamente tratados con poli-L lisina 1 mg/mL. Después de aproximadamente 3 días los astrocitos recuperan su morfología basal para luego realizar inmunofluorescencias

#### Fijación e inmunofluorescencia

Se permeabilizaron las células con 500µL de PBS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM; KCl 2.7mM y NaCl 137mM) Tritón X-100 0,2% durante 5 minutos, luego se lavó 3 veces con PBS por 5 minutos cada vez. Después, se bloqueó con 500µL de PBSA 5% a temperatura ambiente durante una hora (BSA N° de catálogo P06-1391050 PAN-Biotech). Para esta técnica el anticuerpo primario se diluyó en PBSA 1% y se depositó en cubreobjeto con astrocitos, incubándose a 4°C toda la noche. Los anticuerpos usados fueron anti-GFAP (Sigma Aldrich C9205 dilución 1:200); anti-Vimentina (Abcam #AB92547 dilución 1:500); anti-Aldh1l1 (Abcam ab87117 dilución 1:200); anti-Cd11b (Dilución 1:200). Después, se lavó 3 veces con PBS 1X por 5 minutos e incubó con el anticuerpo secundario por 90 minutos a temperatura ambiente. La sonda DAPI se agregó en el primer lavado posterior a la incubación con anticuerpo secundario, por 5 minutos. Se lavó nuevamente con PBS 1X por 5 minutos, 3 veces, después otro lavado con agua estéril por 5 minutos y luego se selló el cubreobjetos con los astrocitos en portaobjetos con el medio de montaje Fluorsave™ (N° catálogo 346789, Millipore).

#### Análisis de datos transcriptómicos

Para realizar este análisis se siguió el siguiente protocolo indicado en la Figura 1.

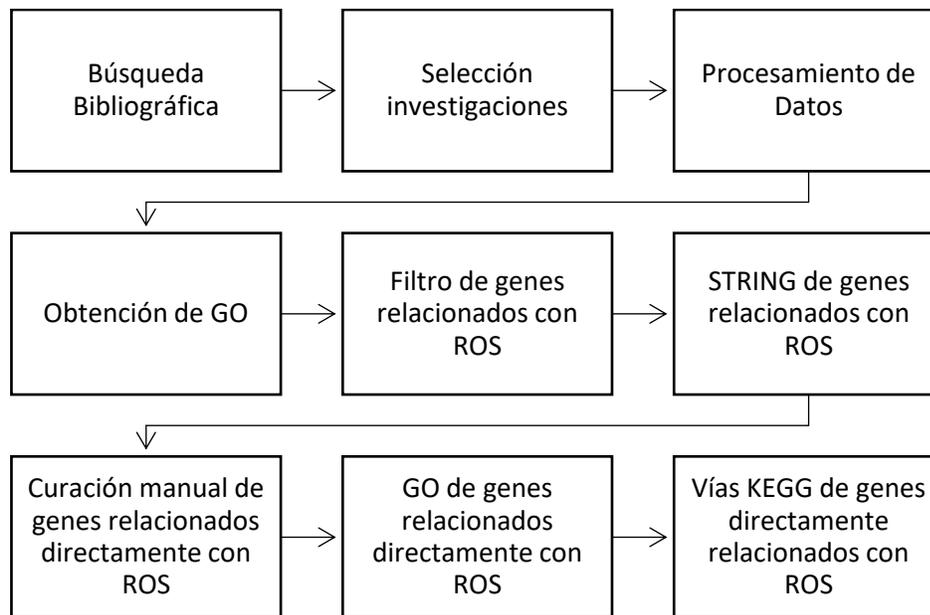


Figura 1. Visión general del flujo de trabajo utilizado para obtener y trabajar con los datos de las diferentes transcriptómicas.

### **Búsqueda bibliográfica**

Para la búsqueda de investigaciones relacionados con transcriptómicas realizadas en astrocitos de cortezas de ratones envejecidos se usaron las plataformas de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y <https://scholar.google.com/> usando en sus respectivas herramientas de búsqueda, las palabras claves “transcriptomic”, “aging”, “astrocyte” y “cortex”. De estos, fueron escogidas sólo aquellas investigaciones que estaban relacionadas estrictamente a estos términos mencionados, es decir transcriptómicas de comparación entre un individuo joven y otro envejecido, según los parámetros de cada investigación, y que contengan entre los tejidos muestras de corteza cerebral.

### **Selección de genes que cambian en el envejecimiento relacionados con el metabolismo de ROS y curación manual**

De las investigaciones seleccionadas, se descargaron los datos desde las páginas señaladas de cada investigación: “*Table S5. Pathway Analysis of Astrocyte Aging Changes across Regions*” de la investigación de Boisvert y cols. (2018); “*Dataset\_S03*”,

de la investigación de Clarke y cols. (2018); “*Supplementary Table 6 Differential gene expression análisis*”, de la investigación de Tabula Muris Consortium; y “*Table S4. Significant Astrocyte-Expressed Gene Expression Changes in Aging*”, de la investigación de Ximerakis y cols. En todos los datos de las 4 investigaciones mencionadas, están señalados aquellos genes que cambian significativamente durante el envejecimiento.

Estudio Clarke y cols.

En la lista, están los genes que cambian su expresión entre las muestras de 10 meses y 2 años, que alcanzan una significancia  $p \leq 0,05$  y que las veces de cambio (*Fold Change* o *FC*) entre una muestra y otra sea al menos del doble ( $FC \geq 2$  o  $\text{Log}_2(FC) \geq 1$ ). De esta lista, se separaron aquellos cuyos  $\text{Log}_2(FC)$  fuese positivos (Aumento de la expresión de un gen durante el envejecimiento) de los  $\text{Log}_2(FC)$  negativos (disminución de la expresión del gen en el envejecimiento).

Estudio Boisvert y cols.

Del archivo, se unieron las listas de corteza visual y corteza motora con el valor respectivo de  $\text{Log}_2FC$ . En el caso que se repitiera un gen, se usa el valor promedio de  $\text{Log}_2FC$ . Esta lista ya contiene genes que cambian significativamente durante el envejecimiento ( $p \leq 0,05$ ).

Estudio *Tabula Muris*

Del archivo, se tomaron los valores de todos los genes de la columna “*Brain\_Non-Myeloid.astrocyte*” tanto de la pestaña “*DGE\_result.tissue.cell.age\_coef*” que entrega los valores de  $\text{Log}_2FC$ , como de la pestaña “*DGE\_result.tissue.cell.bh\_p*” que entrega los valores del p-valor ajustado (*p-adj*). Luego fueron filtrados aquellos genes con  $p\text{-adj} \leq 0,01$  (p-valor ajustado significativo para transcriptómicas tipo *single cell*, según los

autores) y un LogFC mayor a 0,005, si aumenta en el envejecimiento y menor a 0,005, si disminuye en el envejecimiento, lo que representa un 10% de cambio, umbral establecido por los autores.

Estudio Ximerakis y cols.

Del archivo, en la pestaña “ASC” (Astrocitos), se usan los valores de las columnas “Gene”, “p-adj” y “LogFC” y se realiza el mismo trabajo anterior: filtrar aquellos genes con  $p\text{-adj} \leq 0,01$  y  $\text{LogFC} \geq 0.005$ , umbral también establecido por los autores.

En cada lista, de cada estudio de forma independiente, se usó la herramienta de la página <https://david-d.ncicrf.gov/> de DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) para encontrar el identificador de la NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) llamado ENTREZ Gene ID, el cual entrega un identificador único a un gen de una especie específica, en un loci específico. Aquellos que tienen este identificador único son llamados “mapeados”. Luego, la lista de genes con nombres ENTREZ, se ingresan a la herramienta de anotación funcional (*Functional Annotation Tool*) y así obtener los términos de Ontología Genética (*Gene Ontology terms* o términos GO) asociados a cada gen, si hay términos GO asociados se dice que son genes anotados en DAVID. Luego, se usa la herramienta de búsqueda del programa Excel para encontrar y filtrar todos los genes con un término GO asociado a especies reactivas de oxígeno (ROS). Los posibles términos GO que existen relacionado a ROS se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Términos *Gene Ontology* relacionados a especies reactivas de oxígeno

age-dependent response to oxidative stress	regulation of reactive oxygen species metabolic process by negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
age-dependent response to reactive oxygen species	regulation of reactive oxygen species metabolic process by positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
cellular age-dependent response to reactive oxygen species	regulation of response to reactive oxygen species
cellular response to oxidative stress	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to oxidative stress
cellular response to reactive oxygen species	regulation of translation in response to oxidative stress
effector-mediated defense to host-produced reactive oxygen species	respiratory burst at fertilization
induction by symbiont of defense-related host reactive oxygen species production	respiratory burst involved in inflammatory response
intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress	symbiont defense to host-produced reactive oxygen species
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to oxidative stress	response to reactive oxygen species
negative regulation of translation in response to oxidative stress	response to oxidative stress
neuron intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress	regulation of reactive oxygen species biosynthetic process
oxidative stress-induced premature senescence	regulation of reactive oxygen species metabolic process
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to oxidative stress	positive regulation of reactive oxygen species biosynthetic process
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to reactive oxygen species	positive regulation of reactive oxygen species metabolic process
positive regulation of translation in response to oxidative stress	positive regulation of response to reactive oxygen species
programmed cell death in response to reactive oxygen species	negative regulation of response to reactive oxygen species
Reactive oxygen species biosynthetic process	negative regulation of reactive oxygen species biosynthetic process
Reactive oxygen species metabolic process	negative regulation of reactive oxygen species metabolic process

Una vez obtenida la lista con todos los genes que cambian durante el envejecimiento relacionados a ROS de todas las transcriptómicas, se realiza una primera curación manual de estos genes, discriminando según la función conocida de cada gen, en el cual se eliminan a aquellos que transcriban para factores de transcripción, proteínas de modificaciones postraduccionales, de transducción de señales, reguladores del ciclo celular y otras que no estuviesen relacionados directamente al metabolismo de ROS. La lista resultante son genes Diferenciados del Envejecimiento Relacionados a ROS (DERR). Luego, para tener una lista más acotada, se volvió a realizar una curación manual, ahora considerando solo aquellos genes de proteínas que directamente interactúan con una molécula ROS, la lista resultante son genes diferenciales Directamente Relacionados con el Metabolismo de ROS o DRMR.

Análisis STRING, enriquecimiento de *Gene Ontology* y vías KEGG

Para el análisis de las listas tanto DERR como DRMR se usó el programa Cytoscape, y una de sus aplicaciones, ClueGO, el cual permite generar los diagramas de STRING y a la vez obtener los términos GO más enriquecidos, dependiendo de diferentes parámetros a elegir. Con esta aplicación, también se pudo obtener las rutas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) de los genes seleccionados.

## **Resultados**

### Caracterización de cultivos primarios de astrocitos de cortezas de ratones adultos

Para caracterizar los cambios en astrocitos corticales de ratones adultos se estandarizó el cultivo primario en nuestro laboratorio. Para ello, como primer objetivo, se estableció lograr al menos un 50% de confluencia en los frascos de cultivo y, como segundo objetivo, al menos un 99% de pureza, respecto de contaminación de fibroblastos o microglía. Para lo primero, se hizo un seguimiento en tiempo real del crecimiento celular mediante microscopía de contraste de fase (Figura 2). Aquí se muestra el crecimiento de los astrocitos cada 7 días de cultivo (DIV), hasta los 28 DIV. Los primeros 7 días de cultivo (Figura 2A-D) se observó que, con alrededor de 5-10 células por campo, los astrocitos alargan su forma (Figura 2B y C, indicado con flechas). Luego a los 14 DIV (Figura 2E-L), aparecen las primeras agrupaciones de crecimiento.

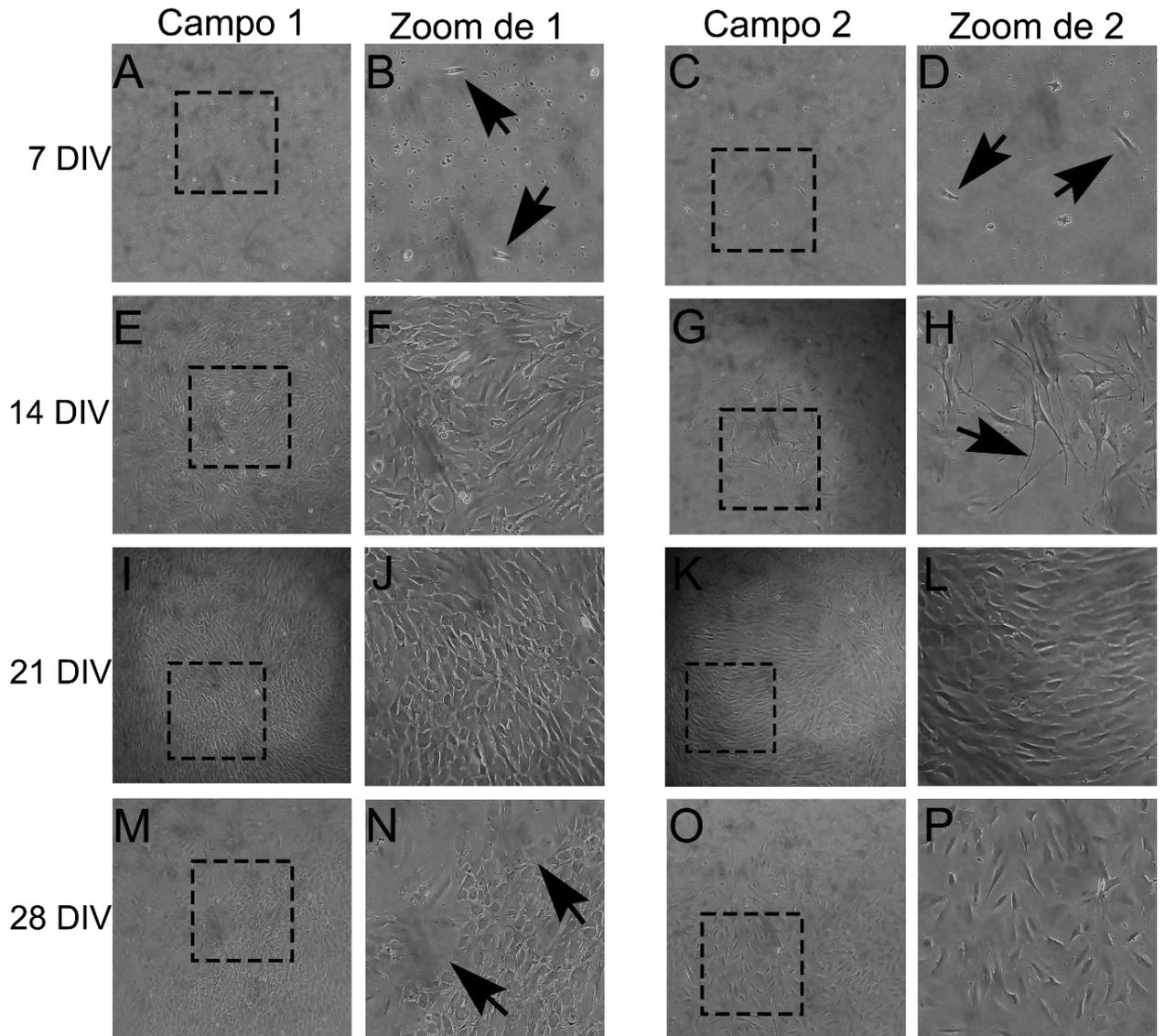


Figura 2. Fotografías en microscopio óptico del crecimiento del cultivo primario de astrocitos proveniente de cortezas de ratones adultos de 11 meses de edad a 20X de magnificación. La primera y tercera columna son un campo visual del frasco de cultivo, en el cual se marcó con un cuadrado negro de borde punteado la zona en que se amplificó la imagen, y, una vez expandida, se muestran en la columna derecha adyacente. A-D son 7DIV. E-H son de 14 DIV. I-L son de 21 DIV. M-P son de 28 DIV. Las flechas en B y D señalan células únicas características de la primera semana de cultivo. La flecha en H muestra un proceso de un astrocito alargado característico de un tipo de agrupación celular reactivo. Las flechas en N señalan el borde de una agrupación celular cuyo crecimiento lo llevó a incidir con otra agrupación cercana.

Algunos de estos, de una densidad celular menor, tienen células que muestran extensiones citoplasmáticas substancialmente alargadas (Figura 2H). Posteriormente, a los 21 DIV (Figura 2I-H) las agrupaciones celulares aumentan de tamaño, con distintos patrones de crecimiento y direccionalidad de crecimiento celular (Figura 2L). A

los 28 DIV (Figura 2M-P) hay agrupaciones celulares que aumentaron de tamaño hasta encontrarse con otros clústeres, diferenciándose por el contraste en los patrones de crecimiento (flechas en Figura 2N). En esta etapa de crecimiento, algunos clústeres altamente densos se elevan por sobre el plano del frasco de cultivo (Figura 2 O y P), distinguible por bordes celulares difusos. Los patrones de crecimiento posterior a los 28 DIV fueron similares a los días anteriores, por lo que se detuvo el seguimiento en fotografías. A los 70 DIV se alcanzó aproximadamente el 50% de confluencia total del frasco.

Para evaluar la pureza de estos cultivos respecto a la contaminación de fibroblastos y microglía, se realizó inmunofluorescencia en microscopía confocal, con los astrocitos anteriores subcultivados en un cubreobjetos de vidrio. Se usaron anticuerpos anti-Gfap (marcador específico de astrocitos) y anti-vimentina (marcador inespecífico de fibroblastos expresado también en astrocitos), y el marcador de núcleo celular DAPI. En la Figura 3 se observa que, todas las células marcadas para vimentina, también lo están para Gfap, por lo que son consideradas astrocitos. Como no se observaron células sólo positivas para vimentina, se considera este cultivo como libre de fibroblastos. Al mismo tiempo, se observaron las variadas morfologías de los astrocitos. En las Figura 2F-J, en un contexto de baja confluencia celular, los astrocitos generan procesos que se estiran hasta alcanzar otras células cercanas (morfología estrellada). También, en las Figuras 2K-O, y Figura 2P-T, en campos con mayor concentración de células, estas tienden a una morfología extendida (abarcen mas área) y poligonal (con bordes rectos).

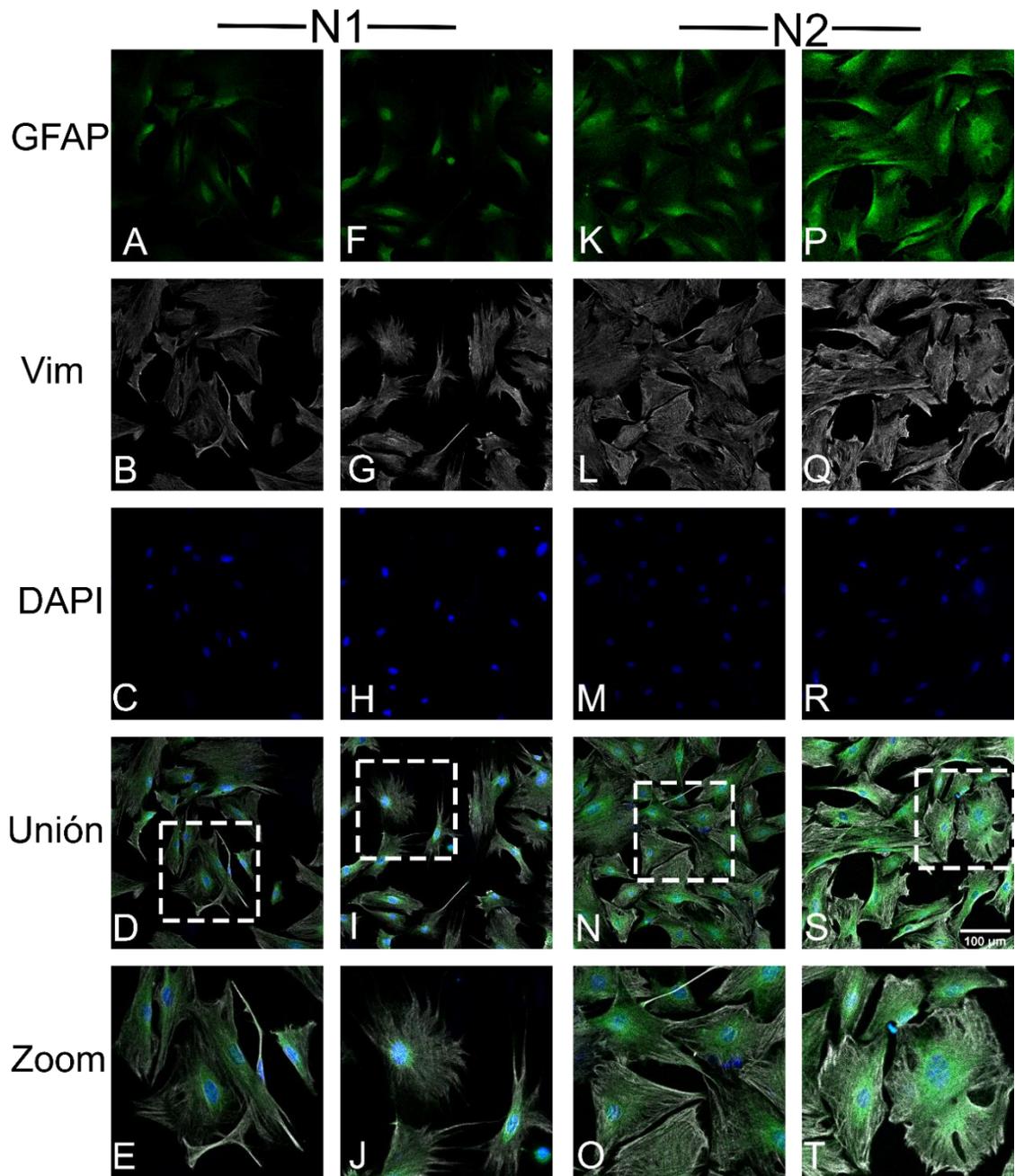


Figura 3. Microscopía de inmunofluorescencia de dos réplicas biológicas de cultivos de astrocitos de 70 DIV provenientes de cortezas de ratones de 11 meses de edad. En verde GFAP, marcador de astrocitos; en blanco, vimentina, un tipo de filamento intermedio; en azul, DAPI, marcador del núcleo. Las primeras dos columnas corresponden a una réplica biológica, N1, en dos distintos campos. Las dos siguientes columnas corresponden a otra réplica biológica distinta, N2, en dos distintos campos. Cada columna es un campo de observación distinto. Las 3 primeras filas son distintos canales de fluorescencia del mismo campo de observación, siendo la 4ta fila "Unión", la superposición de estos tres canales. En esta, el cuadrado punteado es amplificado digitalmente y mostrado en la fila "Zoom", de mayor magnificación.

Como fue establecido que es un cultivo de astrocitos primarios sin fibroblastos, luego se realizaron cultivos a partir de cortezas de ratones adultos jóvenes, de 6 meses, y envejecidos, de 21 meses. Para identificar los tipos celulares, se usaron los marcadores Gfap (astrocitos), vimentina (fibroblasto y astrocitos), Cd11b (microglía) y DAPI (núcleo) (Figura 4).

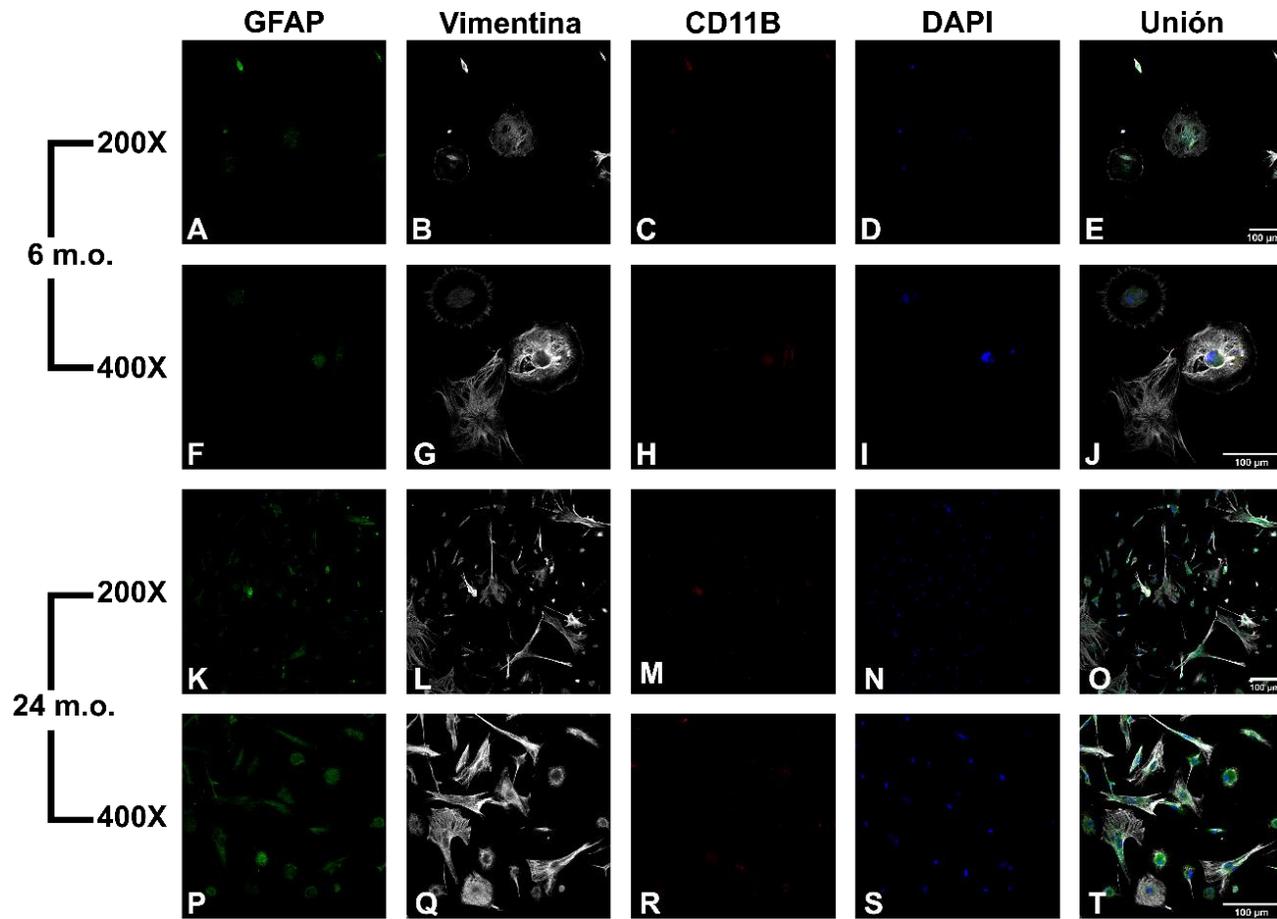


Figura 4. Inmunofluorescencia de cultivo de cortezas de ratones jóvenes (6 meses de edad) y jóvenes envejecidos (24 meses de edad) en dos magnificaciones distintas, usando marcadores de tipo celular. Cada fila es un campo en la magnificación especificada y cada columna es el marcador de tipo celular usado. En verde, GFAP, marcador específico de astrocitos; en gris, Vimentina, marcador inespecífico de fibroblastos; en rojo, CD11B, marcador específico de microglía; en azul, DAPI, marcador de núcleo.

En la Figura 4, todas las células positivas para vimentina lo son también para Gfap, confirmando que son astrocitos. También se encontraron algunas células positivas para Cd11b, Gfap y vimentina. Se observó que Gfap tiene mayor fluorescencia en los cultivos provenientes de ratones de 24 meses, en comparación a los de 6 meses (Figura 4A y K). Además, la distribución de Gfap cubre mayor área dentro de la célula, a los 24 meses respecto de los 6 meses (Figura 5F y P). Dada esta diferencia de Gfap como marcador de astrocitos, se usó otro marcador de astrocitos, Aldh111, junto a Gfap y faloidina (actina). En la Figura 5, las células positivas para faloidina, también lo son para Gfap y Aldh111 (Figura 5J, O y T). Al comparar en muestras de joven y viejo, se observa que la marca de fluorescencia de Aldh111 es constante entre las muestras de 6 y 24 meses de edad, con tendencia de distribuirse alrededor del núcleo (Figura 5G vs Q). Por otro lado, Gfap (Figuras 5A, F, K y P), tiene mayor fluorescencia en la muestra de 24 meses (Figura 5K y P) respecto a la de 6 meses de edad (Figura 5A y F).

En síntesis, se confirma la pureza de los cultivos de astrocitos de al menos un 99%, con alrededor de 1% respecto de fibroblastos y de microglía, y además que Aldh111 es marcador de astrocitos constante durante el envejecimiento.

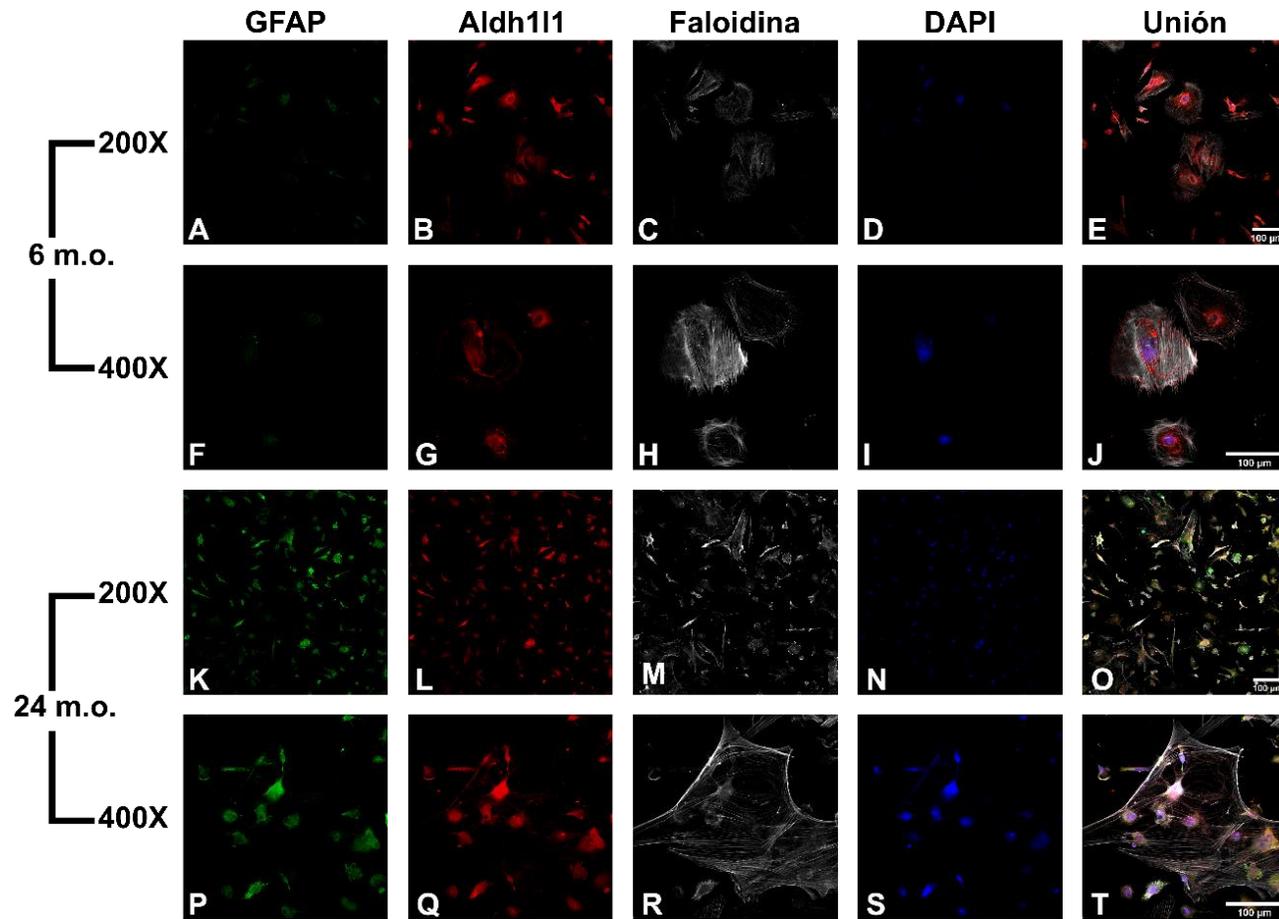


Figura 5. Inmunofluorescencia de cultivo de cortezas de ratones jóvenes (6 meses de edad) y jóvenes envejecidos (24 meses de edad) en dos magnificaciones distintas, usando marcadores de tipo celular. Cada fila es un campo en la magnificación especificada y cada columna es el marcador de tipo celular usado. En verde, GFAP, marcador específico de astrocitos; en gris, faloidina, marcador de filamentos de actina; en rojo, ALDH1L1, marcador específico de astrocitos; y en azul, DAPI, marcador de núcleo.

Análisis transcriptómico de proteínas relacionadas con el manejo de ROS durante el envejecimiento

A fin de entender cómo cambia la expresión de genes relacionados al manejo de ROS en astrocitos y cerebro durante el envejecimiento, se usaron bases de datos de transcriptómicas en la literatura siguiendo las etapas de trabajo mostradas en el diagrama de la Figura 1 en Materiales y Métodos. En primer lugar, se realizó una búsqueda bibliográfica en Pubmed usando las palabras claves: “*transcriptomics*”, “*aging*”, “*astrocytes*” y “*cortex*”. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Investigaciones encontradas que cumplen con los parámetros de búsqueda de cambios de expresión génica durante el envejecimiento en astrocitos. En los rangos etarios, P significa días postnatal; m meses y a años,

<b>Investigación</b>	<b>Modelo</b>	<b>Sección Cerebro</b>	<b>Edades</b>	<b>Técnica</b>
Lee C.K. et al. (2020)(Lee, Weindruch y Prolla, 2000)	Ratón	Neo Corteza y cerebelo	5m y 30m	Microarray
Orre M. et al. (2014)(Orre et al., 2014)	Ratón	Corteza	2,5m y 15-18m	Microarray (FACS)
Soreq L. et al. (2017)(Soreq et al., 2017)	Humano	Corteza frontal, temporal, occipital, cerebelo, sustancia nigra, tálamo, putamen, hipocampo, médula	16-44a; 45-74a; y ≥75a	RNA-seq)
Clarke L.E. et al (2018)(Clarke et al., 2018)	Ratón	Hipocampo, estriado y corteza	P7, P32, 2,5m, 9,5m, 2a	RNAseq –TRAP
Boisvert M.M. et al (2018)(Boisvert et al., 2018)	Ratón	Corteza visual, motora, cerebelo, hipotálamo	4m y 24m	RNAseq- RiboTag

Ximerakis M., et al. (2019)(Ximerakis <i>et al.</i> , 2019)	Ratón	Todo el cerebro menos rombencéfalo o cerebro posterior	2-3m y 21-23m	scRNA-seq
Tabula Muris Consortium (2020)(Tabula Muris Consortium, 2020)	Ratón	Corteza, hipocampo, estriado, cerebelo	1, 3,18,21,24 y 30m	scRNA-seq
Pan J. et al (2020)(Pan <i>et al.</i> , 2020)	Ratón	Astrocitos de todo el cerebro (seleccionados por presencia de proteína ASCA-2 (especifica de astrocitos))	2m, 4m, 6m, 9m y 12m	RNAseq (FACS)

De los estudios de la Tabla 2, se seleccionó el par Boisvert et al. (2018) con Clarke et. Al. (2018) (RNAseq) y el par Ximerakis M. (2018) con Tabula Muris Consortium (2020) (scRNA) por tener metodologías análogas entre sí.

**Selección de genes que cambian durante el envejecimiento, análisis STRING y enriquecimiento de términos de Gene Ontology (GO)**

Para ambos pares de investigaciones, de tipo RNAseq o scRNA-Seq, fueron extraídas las listas de genes expresados diferencialmente, obteniéndose una lista unificada para cada grupo de transcriptómicas, mostrado en las siguientes secciones.

***RNA-seq***

Los datos obtenidos de Boisvert et al. (2018) fueron tratados según lo descrito en Materiales y Métodos. El número de genes obtenidos según su tipo de regulación

durante el envejecimiento, y zona cerebral, se muestra en la Tabla 3, donde todos los genes mapeados también fueron anotados en DAVID.

Tabla 3. Número de genes en las listas de transcriptómicas obtenidas a partir del estudio de Boisvert et al 2018.

	Número de genes	
	Regulados Positivamente	Regulados Negativamente
Corteza Visual	76	59
Corteza Motora	43	33
Corteza visual + motora	97	76
Mapeados	97	75
Anotados en DAVID	97	75

Se realizó el mismo tratamiento con los datos de Clarke et al. 2018, incluyendo hipocampo, dado el gran número de genes diferencialmente expresados durante el envejecimiento en esta región (aproximadamente 6 veces más en hipocampo que en corteza). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Número de genes en las listas de transcriptómicas obtenidas a partir del estudio de Clarke et al 2018.

	Corteza		Hipocampo	
	Regulados Positivamente	Regulados Negativamente	Regulados Positivamente	Regulados Negativamente
Iniciales	44	14	163	205
Mapeados	44	14	161	192
Anotados en DAVID	44	13	161	188

En total, un 97% de los genes de la base de Clarke están mapeados, en la base de DAVID, y de estos, un 99% están anotados. En particular, de los genes de corteza, un 1,7% no están anotados, mientras que los de hipocampo fue de 5,2%.

***RNA-seq de célula única (scRNA-Seq)***

Se extrajeron los datos desde el estudio de Tabula Muris (2020) de genes que cambian durante el envejecimiento en astrocitos provenientes de corteza, hipocampo, estriado y cerebelo en conjunto. Luego, se seleccionaron según lo descrito en Materiales y Métodos. Este mismo procedimiento también se realizó con los datos de Ximerakis et. al. Los resultados de estos filtros se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Número de genes obtenidos de cada base de datos de transcriptómicas según los filtros que se van aplicando.

Filtro	Tabula Muris Consortium (2020)		Ximerakis et al. (2019)	
	Regulados Positivamente	Regulados Negativamente	Regulados Positivamente	Regulados Negativamente
Genes Iniciales	5385	7654	6582	6561
p-value<0,01	1006	1995	182	206
Log2(FC)>  0,005	463	831	182	206
Mapeados	429	795	177	196
Anotados in DAVID	428	789	166	195

De los genes iniciales en la investigación de Tabula Muris Consortium (Tabla 5), un 10% presentan cambios significativos (Fold-Change > 2 y p-value <0,05). También, un 95% de ellos tuvieron anotaciones en la base de datos DAVID. Por otro lado, en el caso de la investigación de Ximerakis y cols. sólo un 3% de los datos totales fueron

significativos según p-value y log2(FC), y de estos, un 93% presentan anotaciones GO en la base de datos de DAVID.

### Genes relacionados al metabolismo de especies reactivas de oxígeno.

Una vez obtenida la lista de genes que cambian en el envejecimiento anotados en DAVID, fueron filtrados aquellos asociados al metabolismo de ROS, como se describe en Materiales y Métodos, creándose la lista de 84 genes Diferenciales en el Envejecimiento Relacionados a ROS (genes DERR). El resultado se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Genes que cambian con el envejecimiento y relacionados al metabolismo de ROS (genes DERR) en distintas transcriptómicas. En azul aquellas que están relacionadas directamente con ROS.

	Regulados Positivamente		Regulados Negativamente	
Boisvert Corteza	Cdkn2a Fbln5 Trim30a		Met Cbx8 Dusp1 Cyr61	Mycn Nr4a3 Fos Cdk1
Clarke Corteza	Cyr61 Apod	Gpr37	Hdac4	
Clarke Hipocampo	Apod Slc7a2 Ogt	Pink1 Gpr37	Romo1 Hdac4 Atox1 Bak1	Gpx3 Pon3 Ucp2 Aqp1
Ximerakis Cerebro entero	Ogt Bcl2 Tspo Fbln5	Gstp1 Txnip Apod	Oser1 Glrx2 Ddah2 Prdx1 Cst3	Prdx5 Psap Rps3 Cycs Ndufa13
Tabula Muris Cerebro Completo	Fos Eif5a Gpx3 Park7 Sod3 Pld2 Rps3 Abl1	Prdx5 Kdm6b Eif6 Stat1 Tspo Spr Gstp1 Sod2	Gpx1 Jun Mapk14 Hspd1 Ndufa13 Itgav Arf4 Slc7a2	Ndufs1 Axl Pink1 Foxo1 Eef1a1 Cat Psap Vdac1

	Hyal2 Endog Dynll1	Ppp5c Atpif1 Gm11627	Prdx3
--	--------------------------	----------------------------	-------

De la Tabla 6, se identificaron genes que están asociados a procesos o compartimientos celulares, de interés relacionado tanto a envejecimiento como a señalización por ROS. Estos son mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7. Categorías de genes que cambian durante el envejecimiento relacionados con especies reactivas de oxígeno

<i>Genes asociados al envejecimiento</i>	<i>Genes asociados a mitocondria</i>	<i>Reguladores del ciclo celular</i>
Hdac4 Cdkn2	Atpif1, Bcl2, Endog, Glrx2, Hspd1, Ndufs1, Pink1, Pon3, Prdx3, Romo1, Sod3, Vdac1, Eif6, Foxo1, Cycs	Abl1, Axl, Bak1, Bcl2, Cdk1, Cyr61, Met, Nr4a3 y Stat1

Por otro lado, se utilizó STRING para buscar las relaciones conocidas entre los genes DERR (Tabla 5), obteniéndose las anotaciones mostradas en la Figura 6, donde fueron eliminados los genes huérfanos (sin asociaciones con otros genes). Las listas provenientes del estudio Clarke et al, no arrojaron resultados.

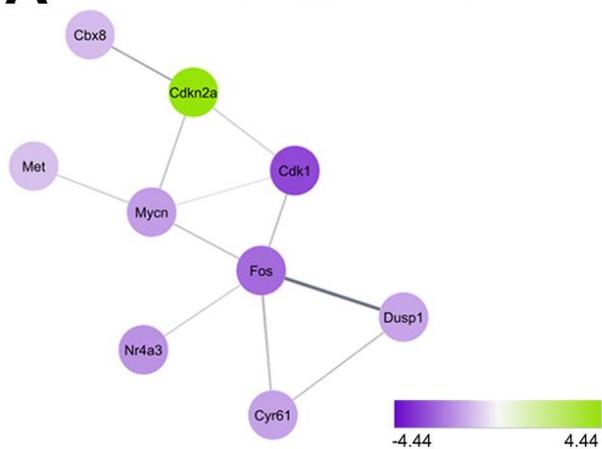
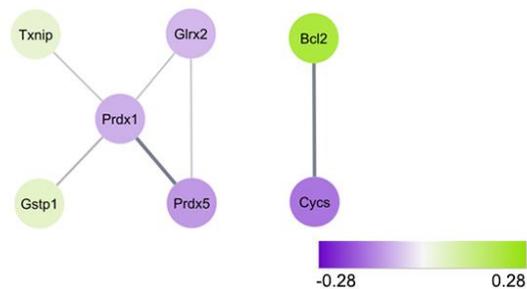
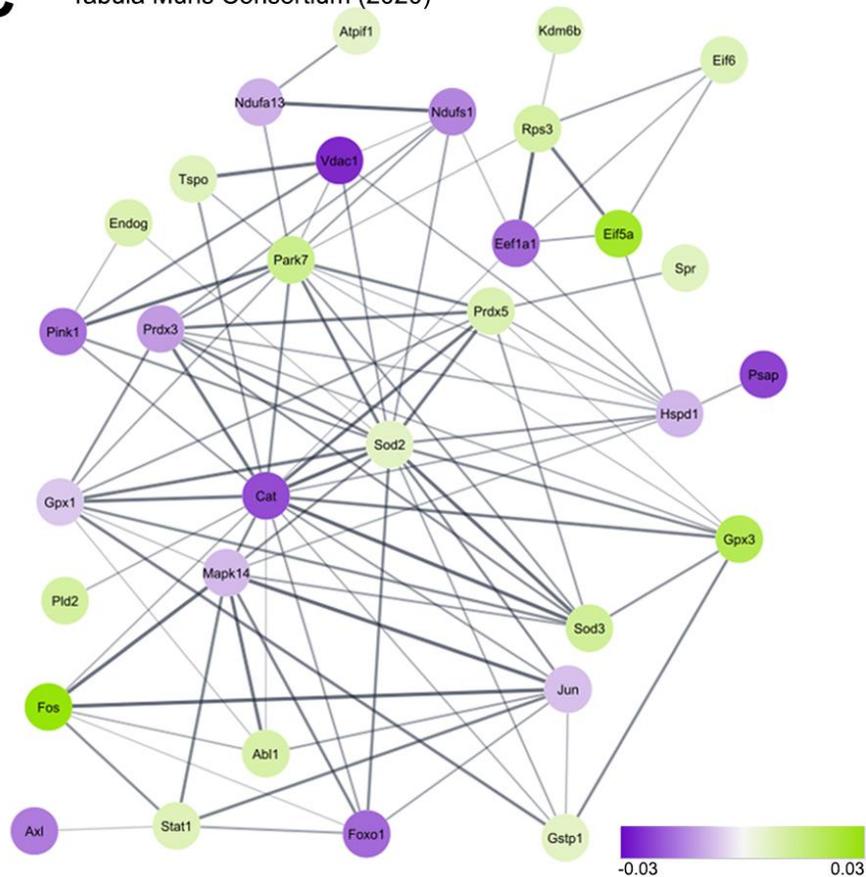
**A** Boisvert et al. (2018) (Sólo corteza)**B** Ximerakis et al. (2019)**C** Tabula Muris Consortium (2020)

Figura 6. Redes STRING de genes que cambian en el envejecimiento que están relacionados con especies reactivas de oxígeno. Verde indica un gen relacionado con ROS que aumenta su expresión en el envejecimiento, y, morado indica un gen relacionado con ROS que disminuye su expresión en el envejecimiento. La gradación depende de las veces de cambio. **A** Genes a partir del de Boisvert et al., (solo corteza). **B** Estudio de transcriptómica de célula única RNAseq de Ximerakis et al (2019). **C** Tabula Muris (2020). Se usaron datos de cerebro entero con un  $p < 0.01$ , y un  $\log FC > |0.005|$ .

De la lista de Boisvert et al. (Figura 6A), la mayoría de los genes DERR disminuyó. *cdkn1* es el gen que más disminuye y *cdkn2a* es el que más aumenta. En la lista de Ximerakis, uno de los clústeres corresponde a enzimas con función antioxidante (izquierda), mientras que el otro clúster corresponde a *bcl2* (proteína proapoptótica) y *cycs*, proteína de la cadena transportadora de electrones afectada por la acción de *bcl2*.

En la lista de Tabula Muris Consortium hay más genes que aumentan su expresión (22) que los que disminuyen durante el envejecimiento (17), de los cuales, genes como *cat*, *prdx3*, *prdx5*, *sod2*, *gpx1* y *gpx3*, están Directamente Relacionados con el Metabolismo de ROS (Genes DRMR). Por ello, este tipo de genes, curados manualmente, se analizaron de forma independiente (Tabla 8). Ninguno de los genes provenientes de las bases de datos de Boisvert o de Clarke en corteza, fueron considerados como relacionados directamente con el manejo de ROS.

Tabla 8 Genes que cambian durante el envejecimiento directamente relacionados al metabolismo de ROS (DRMR).

Regulados Positivamente	Regulados Negativamente
	Gpx3 Pon3
Gstp1	Glrx2 Prdx5 Prdx1
Gpx3 Sod3 Sod2 Prdx5	Gpx1 Prdx3 Ndufs1 Cat

Para contextualizar estos genes dentro de la célula y su efecto en su fisiología, se buscaron las ontologías de genes en la base de datos DAVID. Los resultados de enriquecimiento son mostrados en la Figura 7

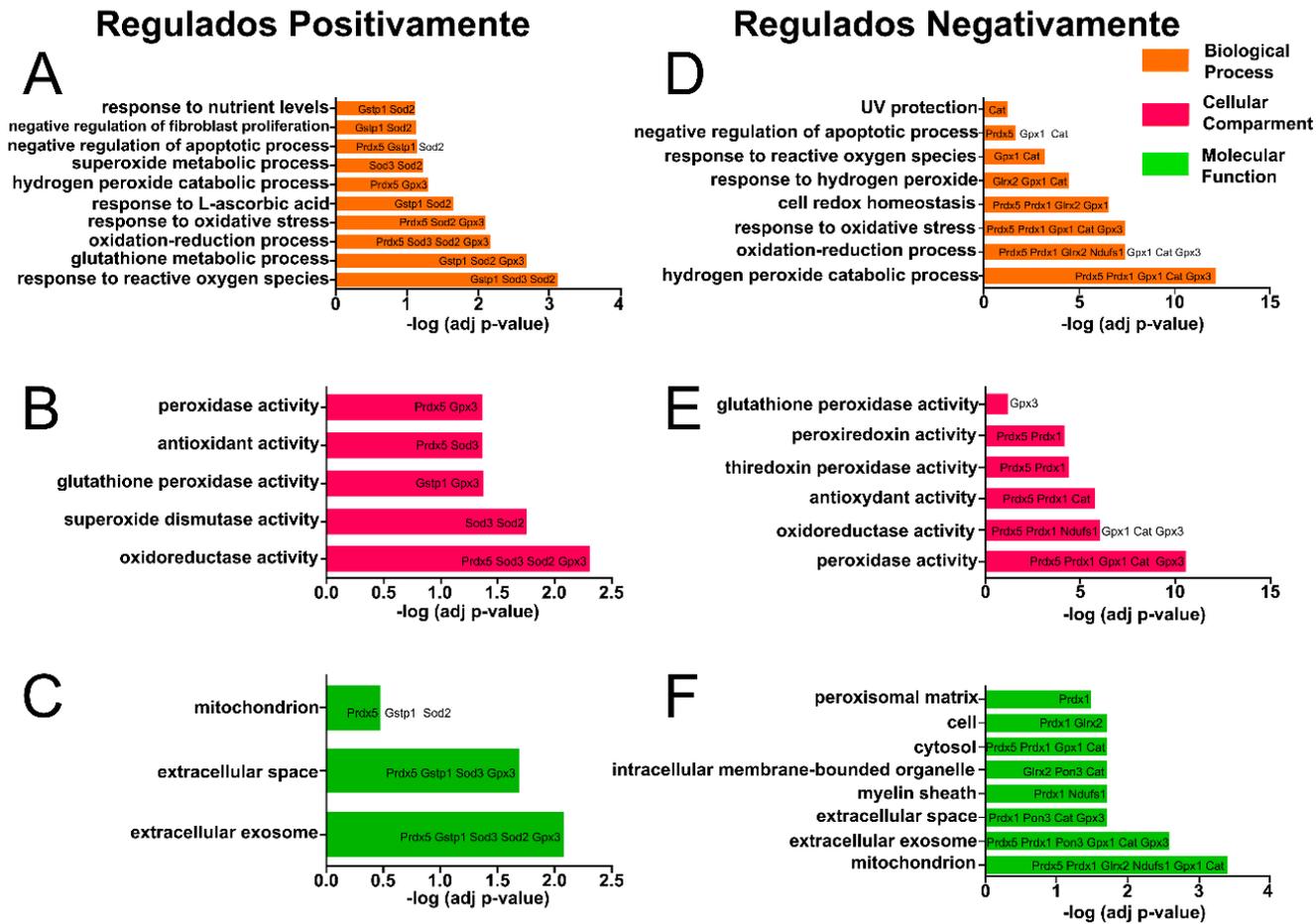


Figura 7. Análisis de enriquecimiento de términos de Gene Ontology. Eje horizontal de los gráficos es el logaritmo negativo del FDR, un tipo de p valor ajustado. A, B y C Son los términos de G.O. de genes que aumentan durante el envejecimiento, en cambio, E, F y G son de aquellos que disminuyen. Dentro de las barras están los genes que corresponden a cada categoría. Si están fuera de la barra no tiene significado.

De forma general, se encontraron términos GO esperables dado el sesgo en los filtros usados, estos son: “response to nutrients levels”, “hydrogen peroxide catabolic process”, y “response to oxidative stress” en Biological process; “superoxide dismutase activity”, “antioxidant activity” y “oxidoreductase activity” en Molecular Function; y, “mitochondrion” y “peroxisomal matrix” en Cellular Compartment. De los términos GO enriquecidos de genes regulados positivamente, se encontraron términos con una relación no evidente con el metabolismo de ROS, como “response to L-ascorbic acid”, “negative regulation of apoptotic process” (Figura 7A), y “extracellular exosome” (Figura

7B). Asimismo, en genes regulados negativamente, se encontraron términos no evidentes como “intracelular membrane-bounded organelle”, “myelin sheath” y “peroxisomal matrix”.

Para complementar el contexto metabólico en que se encuentran las proteínas de los genes DRMR, se analizaron en la aplicación ClueGo de Cytoscape, el cual muestra las vías KEGG en las que están los genes DRMR (Figura 8).

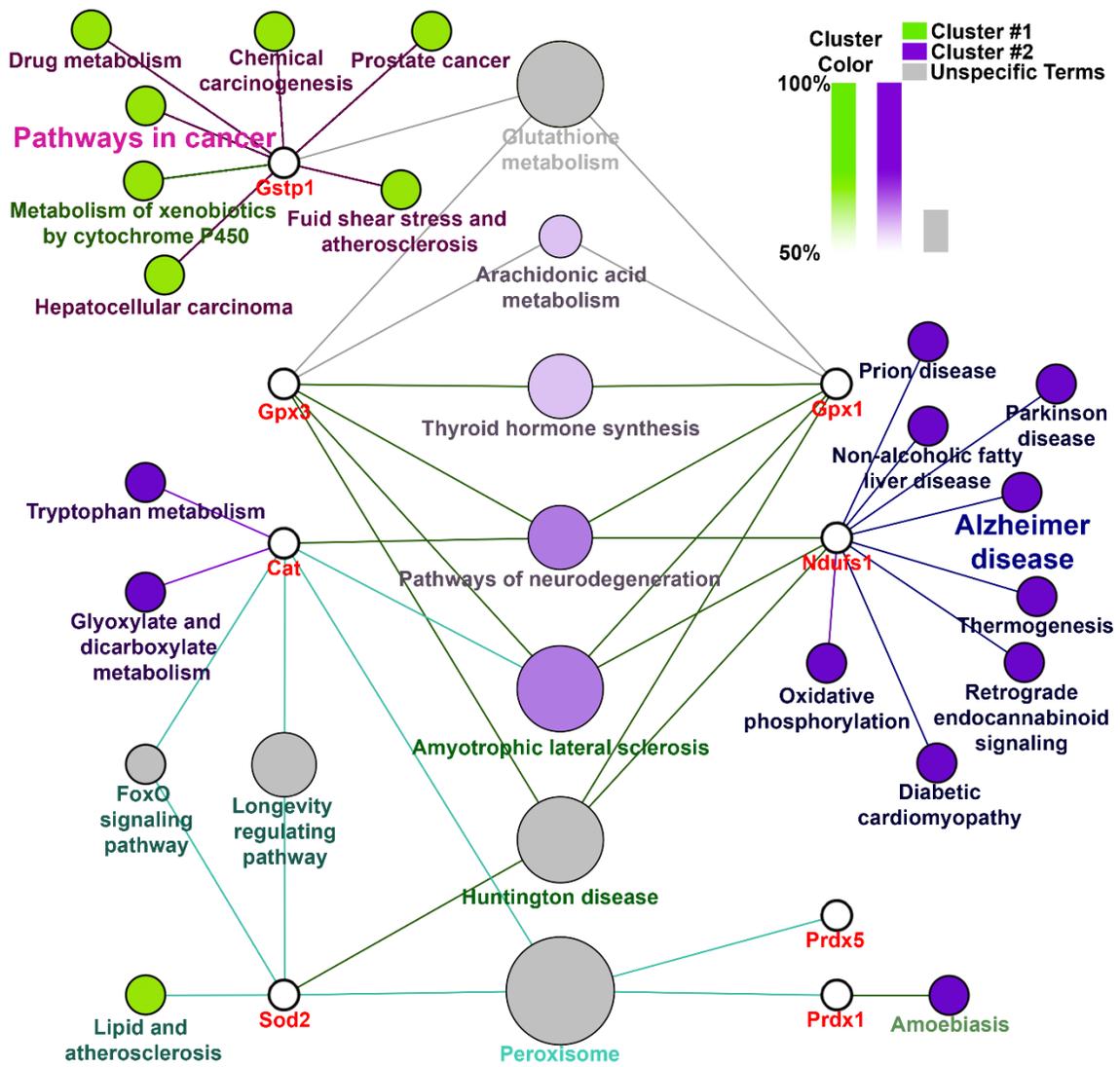


Figura 8. Rutas KEGG de genes que cambian durante el envejecimiento relacionados directamente con el metabolismo de especies reactivas de oxígeno. Clúster#1 (en verde) son genes regulados positivamente durante el envejecimiento; Clúster #2 (en morado) son genes regulados negativamente, a mayor tamaño de cada círculo de un G.O.

Se encontraron rutas metabólicas de vías asociadas a cáncer, Alzheimer, metabolismo de glutatión, regulación de la longevidad y la neurodegeneración, entre otros. También, se encontraron vías que son reguladas tanto positiva como negativamente dentro de las rutas de vías del metabolismo de glutatión, enfermedad de Huntington, señalización vía FoxO, vías de regulación de longevidad y vías relacionadas con el peroxisoma, los que pueden estar dando una pista de los cambios no solo del tipo de proteínas que se

está formando en el envejecimiento, sino que también las modificaciones postraduccionales que estos genes de proteínas de regulación oxido-reducción pueden realizar.

**Análisis de modificaciones post traduccionales del tipo oxidativo en proteínas cuya expresión cambia durante el envejecimiento.**

En un aspecto adicional al trabajo originalmente planteado, establecí una colaboración con otro miembro de nuestro laboratorio, Michel Jara Beltrán, en la Unidad de investigación “Evaluación preliminar del efecto de modificaciones postraduccionales asociadas a la oxidación de cisteínas en la función antioxidante de miembros de las familias Gpx y Prdx”.

Las cisteínas son aminoácidos que pueden formar puentes disulfuro en su estado reducido, que se pierden al ser oxidado, cambiando la estructura conformacional de la proteína, y, potencialmente, cambiando su función. *Oximouse* (Xiao et al., 2020) es un compendio completo de la oxidación en las cisteínas del proteoma del ratón en distintos tejidos y su cambio durante el envejecimiento.

Para entender mejor las potenciales modificaciones redox dependientes que pudiesen afectar la función de los genes identificados en nuestra búsqueda, se cruzaron los genes DERR y DRMR con la base de datos *Oximouse*. Así, se obtuvieron, dentro del cerebro todos los sitios de cisteínas de proteínas relacionadas (DERR) y directamente relacionadas (DRMR) con el metabolismo de ROS, en donde ocurren cambios significativos de su estado oxidativo, durante el envejecimiento, mostrado en la Tabla 9.

Tabla 9. Sitios únicos asociados a proteínas de los genes DERR. Los sitios resaltados en gris están asociados a proteínas de los genes DRMR.  $FC_{\text{Brain}}$  es las veces de cambio del estado oxidativo y  $\text{Log}_2$  si es positivo, denota un aumento en el estado oxidativo y si es negativo, una disminución

Proteína	Sitio	$FC_{\text{Brain}}$	$\text{Log}_2$ [ $FC_{\text{Brain}}$ ]	Proteína	Sitio	$FC_{\text{Brain}}$	$\text{Log}_2$ [ $FC_{\text{Brain}}$ ]
abl1	899	0,76	-0,40	NDUFS1	367	1,70	0,77
APOD	28	0,72	-0,47	OGT	323	0,19	-2,42
ARF4	62	0,23	-2,14	OGT	845	0,26	-1,92
BAK1	14	0,29	-1,81	OGT	417	0,76	-0,40
CAT	460	0,59	-0,76	OGT	590	0,77	-0,38
CAT	377	0,68	-0,56	OGT	620	1,11	0,15
CAT	232	0,77	-0,37	OGT	297	1,33	0,41
CAT	425	1,80	0,84	OGT	531	1,74	0,80
CST3	117	0,74	-0,43	OGT	68	2,09	1,06
CST3	103	1,15	0,20	PARK7	53	0,99	-0,01
DDAH2	176	0,56	-0,83	PARK7	46	1,44	0,52
DDAH2	262	0,56	-0,82	PLD2	84	5,66	2,50
DYNLL1	24	0,54	-0,88	PPP5C	208	0,27	-1,88
DYNLL1	56	0,93	-0,10	PPP5C	382	0,42	-1,25
EEF1A1	411	0,53	-0,92	PPP5C	77	0,63	-0,66
EEF1A1	111	0,58	-0,79	PPP5C	404	0,82	-0,29
EIF6	152	0,57	-0,82	PPP5C	139	1,01	0,02
EIF6	110	1,71	0,77	PPP5C	11	1,66	0,73
EIF6	63	2,15	1,10	PRDX1	173	0,88	-0,18
GPX1	76	0,79	-0,35	PRDX3	230	0,64	-0,65
GPX1	154	0,81	-0,31	PRDX5	96	0,69	-0,53
HSPD1	237	0,66	-0,61	PRDX5	200	1,35	0,43
HSPD1	447	0,83	-0,26	RPS3	134	0,77	-0,38
HSPD1	442	1,89	0,92	RPS3	119	1,12	0,17
NDUFS1	564	0,53	-0,92	RPS3	97	1,25	0,32
NDUFS1	554	0,55	-0,86	SPR	160	0,14	-2,89
NDUFS1	75	0,61	-0,72	SPR	235	1,44	0,52
NDUFS1	92	0,67	-0,57	SPR	172	1,53	0,61
NDUFS1	463	0,74	-0,44	VDAC1	245	0,24	-2,08
NDUFS1	78	1,09	0,12	VDAC1	140	1,83	0,87
NDUFS1	64	1,38	0,46				

De estas proteínas, 16 de las 23 encontradas poseen más de un sitio de regulación por óxido-reducción, siendo Ndufs1 y Ogt las proteínas con más sitios de regulación encontrados, con 8 residuos de cisteínas modificados con el envejecimiento en ambos

casos. También, se encontró que Spr, Ogt y Pldl1 son las proteínas con cisteínas únicas con mayor cambio en la oxidación (dado el *fold change*) durante el envejecimiento.

En una secuencia aminoacídica de una proteína puede haber cisteínas que estén muy cerca entre sí, por lo que, durante la proteómica, se encontrarán dentro del mismo oligopéptido, dando un estado de oxidación promedio en una lista aparte de “sitios compuestos”. Se buscaron las proteínas DERR dentro de la lista de sitios compuestos de *Oximouse* (Tabla 10), y se encontraron 4 proteínas con sitios de cisteínas que cambian su estado de oxidación durante el envejecimiento, de las cuales una (Prdx1) estaba dentro de la categoría DRMR.

Tabla 10. Sitios compuestos asociados a proteínas de los genes DERR. El sitio resaltado en gris está asociados a genes DRMR. FC<sub>brain</sub> es las veces de cambio del estado oxidativo y Log<sub>2</sub> si es positivo, denota un aumento en el estado oxidativo y si es negativo, una disminución

Proteína	Sitio 1	Sitio 2	FC <sub>Brain</sub>	Log <sub>2</sub> [FC <sub>Brain</sub> ]
EIF6	11	15	1,04	0,06
PRDX1	71	83	0,25	-2,01
PPP5C	442	452	0,72	-0,47
OGT	962	965	1,16	0,21

Para visualizar el cambio del estado oxidativo durante el envejecimiento sólo de proteínas DRMR, se graficó esta lista, ordenada según su aumento o disminución de cambio de oxidación (Figura 9)

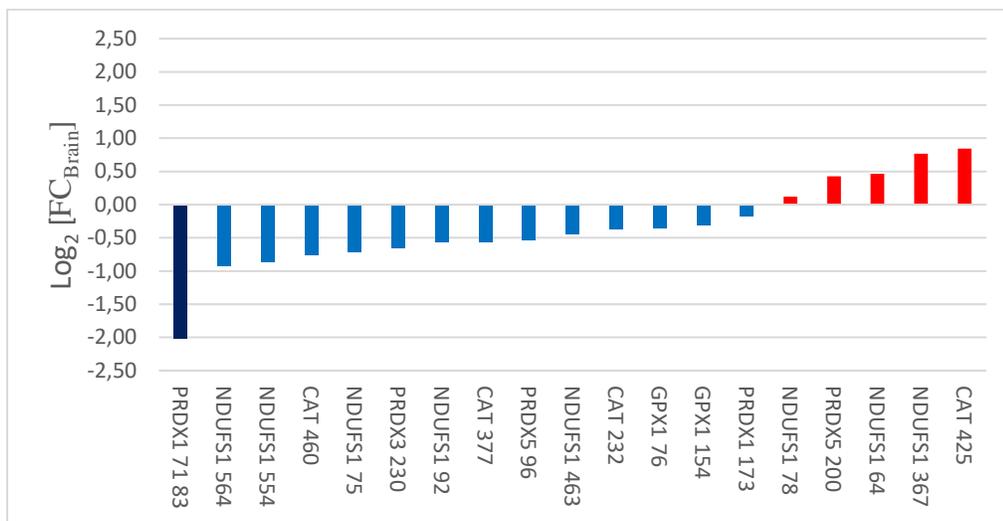


Figura 9. Cambio en el estado oxidativo de cisteínas de proteínas de genes DRMR. En azul son sitios que disminuyen su oxidación durante el envejecimiento, en rojo son sitios que aumentan su oxidación durante el envejecimiento. En azul oscuro, un sitio compuesto. De todas las 11 proteínas DRMR, sólo 5 (Prdx1, Ndufs1, Cat, Prdx3 y Gpx1) tienen al menos una cisteína que cambia su estado oxidativo durante el envejecimiento. La mayoría de estas (a excepción de Prdx3), poseen más de un sitio de cisteína que cambia durante el envejecimiento, sin embargo, el cambio puede ser positivo (aumento del estado oxidativo) en un sitio y negativo en otro (disminución del estado oxidativo), aun estando dentro de la misma proteína. También, se encontró que, de los 19 sitios encontrados en las 5 proteínas DRMR distintas, 14 cisteínas disminuyen su nivel de oxidación y 5 aumenta la oxidación. El sitio compuesto de Prdx1 71 83 fue el que presentó mayor cambio de oxidación en el envejecimiento, respecto al resto de las proteínas DRMR.

## Discusión

Las especies reactivas de oxígeno han dejado de ser consideradas como moléculas sólo dañinas, subproductos de la actividad de la cadena transportadora de electrones, y actualmente se tienen en cuenta como un señalizador importante dentro del metabolismo de la célula, con efectos estudiados a nivel de proteína, organelo, y tejido, alterando la fisiología del organismo (Sies y Jones, 2020). En el contexto del envejecimiento, se ha establecido como una característica clásica el aumento de las especies reactivas de oxígeno, donde aún no está claro si es que estas señales oxidantes son causa o consecuencia de otras respuestas compensatorias a cambios subyacentes a la acumulación de daños a lo largo del tiempo y, por esta misma razón, se hace necesario investigar como los astrocitos se adaptan a estos cambios, tanto por cambios en su expresión genética, como postraduccionales

Caracterización de cultivos primarios de astrocitos de cortezas de ratones adultos

Durante el neurodesarrollo en ratones, la astrogénesis comienza en los días 16 al 18 en el desarrollo embrionario (E16- E18), llegando a un pico proliferativo el día 7 postnatal (P7) (Reemst *et al.*, 2016), y, decreciendo el ritmo hasta llegar a P28 (Su Akdemir, Yu-Szu Huang y Deneen, 2020). En este contexto, al extraer astrocitos desde la corteza de un ratón adulto, estos se encontrarán en un estado maduro que ya no es del tipo proliferativo, si no uno dedicado al mantenimiento de la función neuronal y de la homeostasis; en el que se ha visto que sólo el 1% de los astrocitos están proliferativamente activos (Sirko *et al.*, 2013), por lo que estas células tendrán una respuesta lenta para aumentar su tasa de conversión a células mitóticamente activas (Simon, Götz y Dimou, 2011; Heimann *et al.*, 2017) y así formen un cultivo con la confluencia necesaria para posteriores estudios.

Por ello, es de esperar que el establecimiento de cultivos primarios de astrocitos no neonatales tendría la primera dificultad de poder establecer un protocolo con una disgregación suficiente de separación de tejido, sin ser tan estresante como para que los astrocitos mueran. La siguiente dificultad sería establecer condiciones para que estas células logren sobrevivir y luego, proliferar. En este sentido, la incubación en condiciones de alrededor del 21% de oxígeno gaseoso ambiental podrían provocar que, al solubilizarse en el medio de cultivo, se genere un entorno oxidativo estresante que actúe como señalización de arresto celular o apoptosis (Nave, Tzvetanova y Schirmeier, 2017; Sies, 2017b). En un ambiente hipóxico, por otro lado, se emularon condiciones fisiológicas del cerebro que son de alrededor de un 3% de oxígeno, generando un ambiente menos oxidativo del medio de cultivo de los astrocitos. Otro desafío del establecimiento de este tipo de cultivo es la baja tasa proliferativa de este tipo celular, para llegar a un número y confluencia para estudios posteriores. Este efecto se vio reflejado en la presencia de numerosas células observadas 24 horas luego de la disgregación, vistas en microscopio de contraste de fase (datos no mostrados), pero escasas luego de 7 días *in vitro* (Figuras 2 A-E), con confluencia de 1-5%. Posterior a ello, hubo una baja pero constante tasa proliferativa, con formación de clústeres que aumentaban de área dentro del frasco de cultivo, hasta que a los 60 DIV, alcanzó una confluencia del 40 – 80% entre las réplicas biológicas. Considerando que la proliferación en astrocitos post desarrollo suele ser parte del proceso de activación o reactividad, existe la posibilidad que los astrocitos de este cultivo o un porcentaje importante de ellos si sean reactivos, sumándose a ello el efecto del largo tiempo *in vitro*, luego de los 60 días de incubación. Por esto, sería pertinente evaluar si es que estos astrocitos de cultivo primario son representativos del estado basal de astrocitos en el cerebro adulto y adulto envejecido. Esto podría realizarse comparando

la expresión de señalizadores de inflamación desde astrocitos aislados directamente de la corteza, mediante citometría de flujo versus los astrocitos de cultivos primarios, usados durante este trabajo.

Si bien, estas consideraciones son necesarias para descartar el efecto inflamatorio por extraer y cultivar astrocitos de animales adultos, dadas las condiciones antes descritas, el ambiente debería ser favorable para el crecimiento del cultivo con una baja reactividad, lo suficiente para que solo haya replicación celular y no señales de daño celular. Es por esto, que, esta técnica, es prometedora para futuras investigaciones sobre astrocitos durante el envejecimiento.

Análisis transcriptómico de proteínas relacionadas con el manejo de ROS durante el envejecimiento

El objetivo de esta sección no fue en sí comparar a nivel cuantitativo el cambio de la expresión génica que ocurre en astrocitos durante el envejecimiento a nivel de ROS, sino que una vez encontrados estos genes destacados como claves en el envejecimiento (establecidos previamente por los investigadores de cada estudio), encontrar su importancia y su relación específica dentro de las redes metabólicas que mantienen la homeostasis redox. Uno de los primeros desafíos al comparar más de un estudio sobre transcriptomas, aun siendo en los mismos tipos celulares, son las distintas técnicas específicas que se utilizaron para la extracción de ARN mensajero y su posterior conversión a ADNc, lo que además puede significar un cambio en la forma en que se presentan los datos, por lo que es perentorio encontrar una forma de organizar los datos de manera que queden uniformes. Por otro lado, como fue en este caso, en donde se utilizaron técnicas completamente distintas, tales como RNA-seq y scRNA-seq, los tipos de análisis estadísticos que permiten definir la significancia

cambian, debido a la sensibilidad y a la forma de recolección de datos, como fue visto en la Tabla 2, 3 ,4 y 5 donde se hizo hacer una analogía entre los distintos tipos de datos que se disponían.

### **Selección de genes que cambian durante el envejecimiento, análisis STRING y enriquecimiento de términos de Gene Ontology (GO)**

Al seleccionar genes sólo de corteza en la transcriptómica de Boisvert et al., se notó que, del total, el número de genes que son regulados positivamente es mayor a los regulados negativamente, y lo mismo ocurre en la corteza de la transcriptómica de Clarke et al. (Tabla 2 y 3), sin embargo, en la transcriptómica de célula única de Tabula Muris, hay más genes regulados negativamente, por lo que no se repite esta tendencia, lo que puede estar relacionado con la zona del cerebro de donde provengan los datos, pues en el estudio de Tabula Muris, son de cerebro completo, lo que puede estar enmascarando los efectos que ocurren diferencialmente en cada región del cerebro, tanto porque los astrocitos presentan una expresión diferencial según la región de la cual provengan (Matias *et al.*, 2019; Batiuk *et al.*, 2020; Lee, Kim y Kim, 2022), como porque durante el envejecimiento también existen cambios diferenciales según la región estudiada (Rozycka *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2020).

### **Genes relacionados al metabolismo de especies reactivas de oxígeno.**

Al separar aquellos genes según sus términos GO asociados a especies reactivas de oxígeno, representados en la Tabla 5, se encontraron genes que codificaban para diversas proteínas relacionadas a la función mitocondrial como algunas que participan en la regulación de la producción de ATP (*atpif1*, *ndufs1*, *romo1*), mantención de homeostasis mitocondrial y antioxidantes mitocondriales (*glrx2*, *pink1*, *pon3*, *prdx3*, *sod3*), otras relacionadas a la permeabilidad de la membrana externa (*bcl2*, *vdac1*), y

otras de plegamiento correcto de proteínas (*hspd1*). El que se hayan encontrado estos genes es un indicador positivo sobre la metodología utilizada, pues considerando que la mitocondria es uno de los mayores productores de ROS en las células, es esperable que estos cambiaran su expresión para adecuarse a las nuevas condiciones fisiológicas que supone el envejecimiento. Otro punto a destacar dentro de los grupos de genes encontrados fueron factores de transcripción, *abl1*, *axl*, *bak1*, *bcl2*, *cdk1*, *cyr61*, *met*, *nr4a3* y *stat1* relacionados con la proliferación y el ciclo celular, que, consistentemente con lo anteriormente mencionado, da cuenta de la otra cara de la función de los ROS como señalizadores, en donde, bajo el supuesto de que ocurre un cambio en la concentración de ROS celular del envejecimiento, esto desencadena vías que llevan a cambios en el ciclo celular, lo que es manifiesto en cambio de expresión de estos genes. Un hallazgo interesante dentro de este contexto, fue el cambio en la expresión de los genes *foxo1* (regulación negativa) y *eif6*, los cuales están relacionados a vías de señalización respecto al uso de glucosa en las células (O-Sullivan *et al.*, 2015), lo que podría implicar que en el envejecimiento, los astrocitos sufren cambios metabólicos (Cotto, Natarajaseenivasan y Langford, 2019), asociados a ROS (Jiang y Cadenas, 2014) que modifican la disponibilidad y uso de glucosa que, en último término, podría afectar el aporte energético que estas realizan para apoyar a las neuronas a través del intercambio de lactato, dando una pista de cómo se interconectan estas redes de estado redox astrocítico y metabolismo neuronal, durante el envejecimiento (Vicente-Gutiérrez, Jiménez-Blasco y Quintana-Cabrera, 2020).

Estas redes pueden ser visualizadas también al usar las redes STRING entre proteínas anotadas por la literatura, fue posible encontrar que, en los genes que cambian durante el envejecimiento y que están relacionados al metabolismo de ROS del transcriptoma

de Boisvert et al (Figura 3A) que estos corresponden a factores de transcripción relacionados la división celular de alguna forma y que todos los que disminuyen su expresión (i.e. *cbx8*, *cdk1*, *mycn*, *cdk1*, *fos*, *nr4a3* y *cyr61*) promueven la proliferación. En cambio, el único que gen que aumento dentro de esta agrupación, *cdkn2a*, es un regulador negativo de la proliferación. Por lo que, en términos generales, este cluster nos muestra una regulación de diferentes vías que llevan a una inhibición de la proliferación celular. Sumado a esto, también se encuentra dentro del cluster la disminución de la expresión del gen *dusp1*, el cual inhibe una respuesta inflamatoria, si junto a esto consideramos a los genes *trim30a* (que inhibe la producción de ROS) y *fbln5* (gene marcador de astrocitos reactivos del tipo A1), lo que podría dar inicio a un estado reactivo generalizado en estos astrocitos corticales, y un mecanismo compensatorio a través de la disminución de la producción de ROS por parte de *trim30a*.

### **Análisis de modificaciones post traduccionales del tipo oxidativo en proteínas cuya expresión cambia durante el envejecimiento.**

Las cisteínas cumplen un rol esencial en la regulación de la actividad de las proteínas, dado que en su cadena lateral poseen un grupo tiol que puede actuar como nucleófilo, y así, anclar moléculas electrófilas, formar puentes disulfuros con otras cisteínas, coordinar metales, participar en la catálisis en los sitios activos de enzimas, y, también, ser un punto de modificación postraduccional por nitrosilación, glutationilación, y oxidación (Liebert, Cross y Templeton, 2006; Spadaro *et al.*, 2010; Maurais y Weerapana, 2019). Al ser susceptibles a oxidarse, las cisteínas pueden funcionar como un interruptor de señalización por peróxido. En este estudio, se encontraron proteínas involucradas en el control del estado REDOX de astrocitos que cambian su expresión

en el envejecimiento, y que, en cruce con la base de datos de Oximouse, poseen cisteínas cuyo estado oxidativo también cambia significativamente en el envejecimiento. De las proteínas encontradas, 14 de 20 en total, tienen un estado de oxidación menor en comparación a los animales más jóvenes, lo que es consistente con lo discutido por los autores del estudio de Oximouse (Xiao *et al.*, 2020), en que los cambios de oxidación en el envejecimiento son más bien específicos de cada proteína, y no un estado generalizado, como se expone en la teoría de radicales libres (Pomatto y Davies, 2018), y además, indicando una segunda capa de modulación en la actividad de estas proteínas, extra a la expresión de las mismas. La proteína NADH-ubiquinona oxidoreductasa (Ndufs1, parte del complejo I de la cadena transportadora de electrones (Read *et al.*, 2021)) fue la proteína con más cisteínas con cambios en el porcentaje de oxidación en el envejecimiento. De las ocho cisteínas que cambiaron en Ndufs1, cuatro pertenecen al módulo N de esta proteína, participando en la coordinación de un clúster hierro-sulfuro (Koopman *et al.*, 2010), con 2 cisteínas que aumentan y 2 que disminuyen su estado de oxidación, lo que podría resultar en una desestabilización de este clúster, disminuyendo el flujo de electrones y así, la producción de ATP.

Por otro lado, el mayor cambio de porcentaje de oxidación ocurrió en los sitios compuestos cisteína 51 y cisteína 83 de peroxirredoxina 1 (Prdx1), enzima que cataliza la reducción de peróxidos a agua. Ambos residuos mencionados son ampliamente conservados en mamíferos (Lee *et al.*, 2007), y están relacionados íntimamente con la función de esta enzima: la cisteína 51, ubicada en el sitio catalítico, es la primera en oxidarse en presencia de peróxido de hidrógeno (Rani *et al.*, 2012). Esta cisteína, además puede formar enlaces disulfuro con la proteína fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato

3-fosfatasa (Mullen *et al.*, 2015) (Pten, supresor tumoral (Chen *et al.*, 2018)), asegurando así su actividad. Por otro lado, también se ha descrito que la oxidación de este sitio favorece su unión a la MAPK fosfatasa 5 (MKP-1), previniendo su inhibición por oxidación, por lo que inactivará por fosforilación a p38MAPK, inhibiendo la senescencia (Turner-Ivey *et al.*, 2013). Por otra parte, la cisteína 83 de Prdx1 es clave para la formación de dímeros o decámeros (Barranco-Medina, Lázaro y Dietz, 2009; Bolduc *et al.*, 2021), altamente estables de Prdx1 en el cual puede actuar en su rol de chaperona (Lee *et al.*, 2007). Juntos, esto nos da cuenta de modificaciones postraduccionales que manejan un control fino de la proliferación celular, la producción de ATP y activación de sistemas de mantención de la proteostasis.

## Conclusiones

- Se estandarizó el cultivo de astrocitos desde cortezas cerebrales de ratones adultos de 6 meses (joven), 11 meses (mediana edad) y 22 meses (envejecido), en al menos un 99% de pureza, con el cual se podrá realizar estudios a futuro sobre cambios en el metabolismo de ROS, en un modelo fidedigno de envejecimiento.
- Genes de astrocitos que cambian durante el envejecimiento y directamente relacionados con el metabolismo de especies reactivas de oxígeno, están asociados a las categorías de *Gene Ontology* de Alzheimer, neurodegeneración y longevidad.
- De los genes de astrocitos relacionados con el metabolismo de especies reactivas de oxígeno que cambian durante envejecimiento y que cambia el porcentaje de oxidación durante el envejecimiento, se destacan *Ndufs1* por ser la proteína con más cisteínas que cambian su oxidación, y *Prdx1*, por tener el mayor porcentaje de cambio de oxidación en el envejecimiento
- Hay modificación específica tanto de la expresión como de la oxidación de proteínas relacionadas al metabolismo de ROS.

## Bibliografía

- Abbott, N.J. *et al.* (2010) “Structure and function of the blood-brain barrier”, *Neurobiology of Disease*, 37(1), pp. 13–25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- Attwell, D. *et al.* (2010) “Glial and neuronal control of brain blood flow”, *Nature*, 468(7321), pp. 232–243. doi:10.1038/nature09613.
- Balcombe, N.R. y Sinclair, A. (2001) “Ageing: Definitions, mechanisms and the magnitude of the problem”, *Bailliere’s Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*, 15(6), pp. 835–849. doi:10.1053/bega.2001.0244.
- Barranco-Medina, S., Lázaro, J.J. y Dietz, K.J. (2009) “The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function”, *FEBS Letters*, 583(12), pp. 1809–1816. doi:10.1016/j.febslet.2009.05.029.
- Batiuk, M.Y. *et al.* (2020) “Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution”, *Nature Communications*, 11(1), pp. 1–15. doi:10.1038/s41467-019-14198-8.
- Bellaver, B., Souza, D.G. y Souza, D.O. (2017) “Hippocampal Astrocyte Cultures from Adult and Aged Rats Reproduce Changes in Glial Functionality Observed in the Aging Brain”, pp. 2969–2985. doi:10.1007/s12035-016-9880-8.
- Boisvert, M.M. *et al.* (2018) “The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain”, *Cell Reports*, 22(1), pp. 269–285. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.039.
- Bokov, A., Chaudhuri, A. y Richardson, A. (2004) “The role of oxidative damage and stress in aging”, *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(10-11 SPEC. ISS.), pp. 811–826. doi:10.1016/j.mad.2004.07.009.
- Bolduc, J. *et al.* (2021) “Peroxiredoxins wear many hats: Factors that fashion their peroxide sensing personalities”, *Redox Biology*, 42. doi:10.1016/j.redox.2021.101959.
- Brawek, B. *et al.* (2010) “Reactive oxygen species (ROS) in the human neocortex: Role of aging and cognition”, *Brain Research Bulletin*, 81(4–5), pp. 484–490. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.10.011.
- Cantley, L.C. (2002) “The phosphoinositide 3-kinase pathway”, *Science*, 296(5573), pp. 1655–1657. doi:10.1126/science.296.5573.1655.
- Chen, C.Y. *et al.* (2018) “PTEN: Tumor suppressor and metabolic regulator”, *Frontiers in Endocrinology*, 9(JUL), pp. 1–12. doi:10.3389/fendo.2018.00338.
- Clarke, L.E. *et al.* (2018) “Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(8), pp. E1896–E1905. doi:10.1073/pnas.1800165115.
- Cotto, B., Natarajaseenivasan, K. y Langford, D. (2019) “Astrocyte activation and altered metabolism in normal aging, age-related CNS diseases, and HAND”, *Journal of NeuroVirology*, 25(5), pp. 722–733. doi:10.1007/s13365-019-00721-6.

- Faissner, A. *et al.* (2010) “Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix”, *Brain Research Reviews*, 63(1–2), pp. 26–38. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.01.001.
- Feng, X. *et al.* (2020) “Brain regions vulnerable and resistant to aging without Alzheimer’s disease”, *PLoS ONE*, 15(7 July), pp. 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0234255.
- Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A. y Bolaños, J.P. (2012) “Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes”, *Biochemical Journal*, 443(1), pp. 3–12. doi:10.1042/BJ20111943.
- Franceschi, C. *et al.* (2018) “Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases”, *Nature Reviews Endocrinology*, 14(10), pp. 576–590. doi:10.1038/s41574-018-0059-4.
- Hamilton, M.L. *et al.* (2001) “Does oxidative damage to DNA increase with age?”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), pp. 10469–10474. doi:10.1073/pnas.171202698.
- Heimann, G. *et al.* (2017) “Changes in the proliferative program limit astrocyte homeostasis in the aged post-traumatic murine cerebral cortex”, *Cerebral Cortex*, 27(8), pp. 4213–4228. doi:10.1093/cercor/bhx112.
- Herculano-Houzel, S. (2014) “The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution”, *Glia*, 62(9), pp. 1377–1391. doi:10.1002/glia.22683.
- Ishii, T. *et al.* (2017) “Aging Cell”, *Aging Cell*, 1(August 2016), pp. 39–51. doi:10.1111/acel.12523.
- Jäkel, S. y Dimou, L. (2017) “Glial cells and their function in the adult brain: A journey through the history of their ablation”, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(February), pp. 1–17. doi:10.3389/fncel.2017.00024.
- Jaul, E. y Barron, J. (2017) “Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population”, *Frontiers in Public Health*, 5(December), pp. 1–7. doi:10.3389/fpubh.2017.00335.
- Ji-Ann Lee, and K.C.M.M.V.H. (2012) “Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations”, *Free Radical Biology and Medicine*, 23(1), pp. 1–7. doi:10.1038/jid.2014.371.
- Jiang, T. y Cadenas, E. (2014) “Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age”, *Aging Cell*, 13(6), pp. 1059–1067. doi:10.1111/acel.12268.
- Johnson, A.A. y Stolzing, A. (2019) “The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease”, *Aging Cell*, 18(6), pp. 1–26. doi:10.1111/acel.13048.
- Kawanishi, S., Hiraku, Y. y Oikawa, S. (2001) “Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging”, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 488(1), pp. 65–76. doi:10.1016/S1383-

5742(00)00059-4.

Koopman, W.J.H. *et al.* (2010) "Mammalian Mitochondrial Complex I":, *Antioxidants & redox signaling*, 12(12).

Kraft, A.D., Johnson, D.A. y Johnson, J.A. (2004) "Nuclear Factor E2-Related Factor 2-Dependent Antioxidant Response Element Activation by tert-Butylhydroquinone and Sulforaphane Occurring Preferentially in Astrocytes Conditions Neurons against Oxidative Insult", *Journal of Neuroscience*, 24(5), pp. 1101–1112. doi:10.1523/JNEUROSCI.3817-03.2004.

Lee, C.K., Weindruch, R. y Prolla, T.A. (2000) "Gene-expression profile of the ageing brain in mice", *Nature Genetics*, 25(3), pp. 294–297. doi:10.1038/77046.

Lee, J., Kim, S.W. y Kim, K.-T. (2022) "Region-Specific Characteristics of Astrocytes and Microglia: A Possible Involvement in Aging and Diseases", *Cells*, 11(12), p. 1902. doi:10.3390/cells11121902.

Lee, W. *et al.* (2007) "Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: The unique presence of Cys83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2", *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), pp. 22011–22022. doi:10.1074/jbc.M610330200.

Liddell, J.R. (2017) *Are astrocytes the predominant cell type for activation of Nrf2 in aging and neurodegeneration?*, *Antioxidants*. doi:10.3390/antiox6030065.

Liebert, M.A., Cross, J. V y Templeton, D.J. (2006) "Protein Cysteine Oxidation TO STIMULATION", 8.

Lin, D.T. *et al.* (2007) "Ca<sup>2+</sup> signaling, mitochondria and sensitivity to oxidative stress in aging astrocytes", *Neurobiology of Aging*, 28(1), pp. 99–111. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.11.004.

Liu, C.Y. *et al.* (2018) "Emerging roles of astrocytes in neuro-vascular unit and the tripartite synapse with emphasis on reactive gliosis in the context of alzheimer's disease", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, pp. 1–12. doi:10.3389/fncel.2018.00193.

López-Otín, C. *et al.* (2013) "The hallmarks of aging", *Cell*, 153(6). doi:10.1016/j.cell.2013.05.039.

Lyublinskaya, O. y Antunes, F. (2019) "Measuring intracellular concentration of hydrogen peroxide with the use of genetically encoded H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor HyPer", *Redox Biology*, 24(April), p. 101200. doi:10.1016/j.redox.2019.101200.

Mandavilli, B.S., Santos, J.H. y Van Houten, B. (2002) "Mitochondrial DNA repair and aging", *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 509(1–2), pp. 127–151. doi:10.1016/S0027-5107(02)00220-8.

Marina, N. *et al.* (2018) "Brain metabolic sensing and metabolic signaling at the level of an astrocyte", *Glia*, 66(6), pp. 1185–1199. doi:10.1002/glia.23283.

Matias, I. *et al.* (2019) "Astrocyte Heterogeneity : Impact to Brain Aging and Disease", 11(March), pp. 1–18. doi:10.3389/fnagi.2019.00059.

- Mattson, M.P. y Arumugam, T. V. (2018) “Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States”, *Cell Metabolism*, 27(6), pp. 1176–1199. doi:10.1016/j.cmet.2018.05.011.
- Maurais, A.J. y Weerapana, E. (2019) “Reactive-cysteine profiling for drug discovery”, *Current Opinion in Chemical Biology*, 50(1), pp. 29–36. doi:10.1016/j.cbpa.2019.02.010.
- Minsal (2014) “Programa nacional de salud de las personas adultas mayores”, *Minsal*, p. 239. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Morinaka, A. *et al.* (2011) “Thioredoxin mediates oxidation-dependent phosphorylation of CRMP2 and growth cone collapse”, *Science Signaling*, 4(170), pp. 1–13. doi:10.1126/scisignal.2001127.
- Mu, W.-C. y Chen, D. (2020) *Nutrient sensing, the oxidative stress response, and stem cell aging*, *Oxidative Stress*. Elsevier Inc. doi:10.1016/b978-0-12-818606-0.00022-5.
- Mullen, L. *et al.* (2015) “Cysteine oxidation targets peroxiredoxins 1 and 2 for exosomal release through a novel mechanism of Redox-dependent secretion”, *Molecular Medicine*, 21(10), pp. 98–108. doi:10.2119/molmed.2015.00033.
- Murman, D.L. (2015) “The Impact of Age on Cognition and the Aging Auditory System”, *Seminars in hearing*, 36(1), pp. 111–121. doi:10.1055/s-0035-1555115.
- Nations, U. (2019) *World Population Ageing 2019, Economic and Social Affairs, Population Division*. Disponible en: <https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WorldPopulationAgeing2019-Report.pdf>.
- Nave, K.A., Tzvetanova, I.D. y Schirmeier, S. (2017) “Glial Cell Evolution: The Origins of a Lipid Store”, *Cell Metabolism*, 26(5), pp. 701–702. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.011.
- Nóbrega-Pereira, S. *et al.* (2016) “G6PD protects from oxidative damage and improves healthspan in mice”, *Nature Communications*, 7, pp. 1–9. doi:10.1038/ncomms10894.
- O-Sullivan, I. *et al.* (2015) “FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization”, *Nature Communications*, 6(May). doi:10.1038/ncomms8079.
- Olivares-Tirado, P. y Salazar B, E. (2006) *Impacto del Envejecimiento en el Gasto en Salud: Chile 2002 - 2020*.
- Orre, M. *et al.* (2014) “Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice”, *Neurobiology of Aging*, 35(1), pp. 1–14. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.008.
- Oswald, M.C.W. *et al.* (2018) “Regulation of neuronal development and function by ROS”, *FEBS Letters*, 592(5), pp. 679–691. doi:10.1002/1873-3468.12972.
- Pan, J. *et al.* (2020) “Transcriptomic profiling of microglia and astrocytes throughout aging”, *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), pp. 1–19. doi:10.1186/s12974-020-01774-9.
- Pertusa, M., Garcı, S. y Rodrı, E. (2007) “Astrocytes aged in vitro show a decreased

neuroprotective capacity”, pp. 794–805. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04369.x.

Pomatto, L.C.D. y Davies, K.J.A. (2018) “Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing”, *Free Radical Biology and Medicine*, 124, pp. 420–430. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.016.

Rani, V. *et al.* (2012) “Prdx1 deficiency in mice promotes tissue specific loss of heterozygosity mediated by deficiency in DNA repair and increased oxidative stress”, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 735(1–2), pp. 39–45. doi:10.1016/j.mrfmmm.2012.04.004.

Ray, P.D., Huang, B.W. y Tsuji, Y. (2012) “Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling”, *Cellular Signalling*, 24(5), pp. 981–990. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008.

Read, A.D. *et al.* (2021) “Mitochondrial iron–sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology: Mitochondrial Fe-S Clusters – a review”, *Redox Biology*, 47. doi:10.1016/j.redox.2021.102164.

Reemst, K. *et al.* (2016) “The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development”, *Frontiers in Human Neuroscience*, 10(NOV2016), pp. 1–28. doi:10.3389/fnhum.2016.00566.

Rink, C. y Khanna, S. (2011) “Significance of Brain Tissue Oxygenation and the Arachidonic Acid Cascade in Stroke”, 14(10).

Rozycka, A. *et al.* (2019) “Glutamate, GABA, and Presynaptic Markers Involved in Neurotransmission Are Differently Affected by Age in Distinct Mouse Brain Regions”, *ACS Chemical Neuroscience*, 10(11), pp. 4449–4461. doi:10.1021/acscemneuro.9b00220.

Schieber, M. y Chandel, N.S. (2014) “ROS function in redox signaling”, *Current Biology*, 24(10), pp. 453–462. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034.

Sengupta, P. (2013) “The laboratory rat: Relating its age with human’s”, *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6), pp. 624–630.

Sies, H. (2017a) “Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress”, *Redox Biology*, 11(November 2016), pp. 613–619. doi:10.1016/j.redox.2016.12.035.

Sies, H. (2017b) “Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress”, *Redox Biology*, 11(January), pp. 613–619. doi:10.1016/j.redox.2016.12.035.

Sies, H. y Jones, D.P. (2020) “Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Springer US, pp. 363–383. doi:10.1038/s41580-020-0230-3.

Simon, C., Götz, M. y Dimou, L. (2011) “Progenitors in the adult cerebral cortex: Cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury”, *Glia*, 59(6), pp. 869–881. doi:10.1002/glia.21156.

Sirko, S. *et al.* (2013) “Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in

response to sonic hedgehog glia”, *Cell Stem Cell*, 12(4), pp. 426–439. doi:10.1016/j.stem.2013.01.019.

Soreq, L. *et al.* (2017) “Major Shifts in Glial Regional Identity Are a Transcriptional Hallmark of Human Brain Aging”, *Cell Reports*, 18(2), pp. 557–570. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.011.

Spadaro, D. *et al.* (2010) “The redox switch: Dynamic regulation of protein function by cysteine modifications”, *Physiologia Plantarum*, 138(4), pp. 360–371. doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01307.x.

Steenman, M. y Lande, G. (2017) “Cardiac aging and heart disease in humans”, *Biophysical Reviews*, 9(2), pp. 131–137. doi:10.1007/s12551-017-0255-9.

Su Akdemir, E., Yu-Szu Huang, A. y Deneen, B. (2020) “Astrocytogenesis: where, when, and how [version 1; peer review: 2 approved]”, *F1000Research*, 9(233). Disponible en: <https://doi.org/10.12688/f1000research.22405.1>.

Tabula Muris Consortium (2020) “A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse.”, *Nature* [Preprint], (June 2019). doi:10.1038/s41586-020-2496-1.

Turner-Ivey, B. *et al.* (2013) “Role for Prdx1 as a specific sensor in redox-regulated senescence in breast cancer”, *Oncogene*, 32(45), pp. 5302–5314. doi:10.1038/onc.2012.624.

Varland, S., Vandekerckhove, J. y Drazic, A. (2019) “Actin Post-translational Modifications: The Cinderella of Cytoskeletal Control”, *Trends in Biochemical Sciences*, 44(6), pp. 502–516. doi:10.1016/j.tibs.2018.11.010.

Vicente-Gutiérrez, C., Jiménez-Blasco, D. y Quintana-Cabrera, R. (2020) “Intertwined ROS and Metabolic Signaling at the Neuron-Astrocyte Interface”, *Neurochemical Research* [Preprint], (0123456789). doi:10.1007/s11064-020-02965-9.

West, A.P. *et al.* (2011) “TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS”, *Nature*, 472(7344), pp. 476–480. doi:10.1038/nature09973.

Wilson, C. *et al.* (2016) “A Feed-Forward Mechanism Involving the NOX Complex and RyR-Mediated Ca<sup>2+</sup> Release During Axonal Specification”, *Journal of Neuroscience*, 36(43), pp. 11107–11119. doi:10.1523/JNEUROSCI.1455-16.2016.

Wilson, C. y González-Billault, C. (2015) “Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: Implications for neuronal development and trafficking”, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(SEPTEMBER), pp. 1–10. doi:10.3389/fncel.2015.00381.

Xiao, H. *et al.* (2020) “A Quantitative Tissue-Specific Landscape of Protein Redox Regulation during Aging”, *Cell*, 180(5), pp. 968–983.e24. doi:10.1016/j.cell.2020.02.012.

Ximerakis, M. *et al.* (2019) “Single-cell transcriptomic profiling of the aging mouse brain”, *Nature Neuroscience*, 22(10), pp. 1696–1708. doi:10.1038/s41593-019-0491-3.