

Trabajo Fin de Grado

Grado en Bioquímica y Biología Molecular

# **Relación bidireccional entre la fagocitosis y el metabolismo microglial**

Autora:

**Paloma-Renata Huguet Rodríguez**

Directora:

**Dra. Amanda Sierra Saavedra**

Co-directora:

**Dra. Maier Lorizate Nogales**

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>2</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>3</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>6</b>
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>14</b>

## 1. RESUMEN

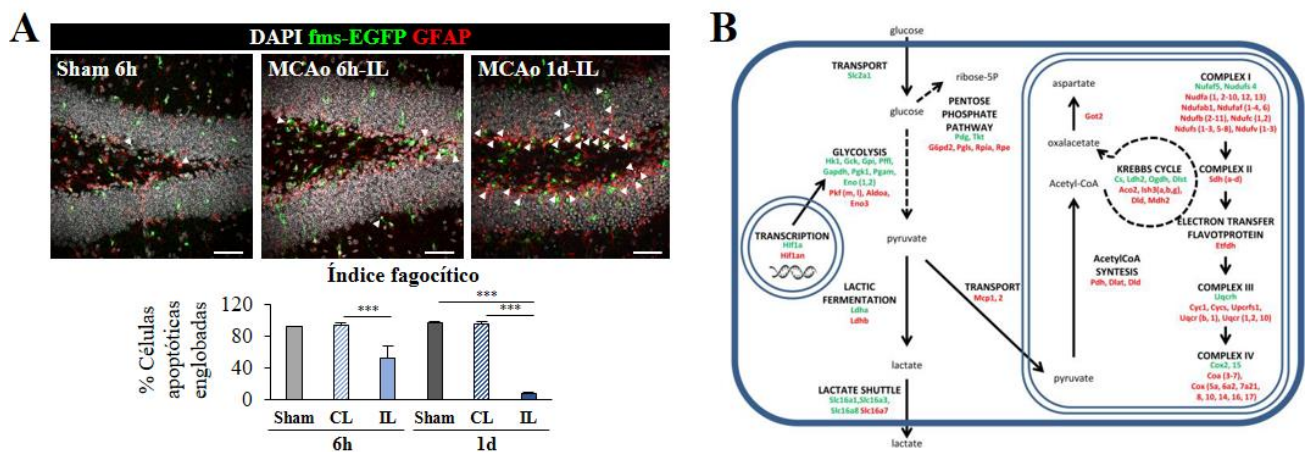
Las células microgliales son los fagocitos profesionales residentes del cerebro, esenciales para mantener la homeostasis tisular retirando residuos celulares y controlando la respuesta inmune. Sin embargo, la fagocitosis microglial es todavía un proceso poco caracterizado. En el presente estudio, hemos demostrado que la privación de oxígeno y nutrientes bloquea la fagocitosis, demostrando así la dependencia de la actividad fagocítica en el metabolismo celular. Además, en respuesta a la fagocitosis, hemos observado un aumento sutil en la expresión del factor de transcripción HIF1 $\alpha$ , proteína que ejerce de regulador maestro de la expresión génica de la glicólisis, y que por tanto podría estar implicada en una remodelación metabólica de la microglía fagocítica. Estos resultados demuestran la posibilidad de que exista una **relación bidireccional entre la fagocitosis y el metabolismo microglial**.

## 2. INTRODUCCIÓN

La **fagocitosis** de residuos celulares apoptóticos y de microorganismos es un proceso esencial de la respuesta inmune innata para el mantenimiento de la homeostasis tisular, porque previene la liberación de contenidos intracelulares tóxicos e induce una respuesta inmunomoduladora<sup>1</sup>. En el cerebro la fagocitosis es ejecutada por la **microglía**, los fagocitos profesionales residentes del Sistema Nervioso Central (SNC)<sup>2</sup>, que retiran los residuos de la apoptosis neuronal que ocurre tanto durante el desarrollo como en enfermedades degenerativas (i.e., epilepsia, Alzheimer, Parkinson, o isquemia-infarto cerebral)<sup>3</sup>. Sin embargo, la fagocitosis microglial es todavía un proceso relativamente desconocido respecto a los mecanismos que emplea, la maquinaria celular involucrada y sus consecuencias funcionales a nivel tisular o para la propia célula<sup>4</sup>. Por ello, en el presente trabajo hemos estudiado el **metabolismo microglial** centrándonos en dos aspectos: por una parte, el impacto del metabolismo en la fagocitosis, y más concretamente la ausencia de oxígeno y nutrientes empleando un modelo de **infarto cerebral** por isquemia; y por otra parte, el impacto de la fagocitosis sobre el metabolismo microglial, enfocándonos en el regulador maestro de la expresión génica de la glicólisis **HIF1 $\alpha$** .

**Microglía e infarto cerebral.** El infarto cerebral por isquemia es una de las causas más comunes de muerte y de discapacidad en el mundo desarrollado<sup>5</sup>, y se caracteriza por la interrupción del suministro sanguíneo regional que lleva a una cascada isquémica induciendo progresivamente muerte neuronal<sup>6</sup>. La microglía se activa rápidamente en la fase aguda del infarto isquémico<sup>7</sup>, mostrando patrones génicos reactivos e inmunomoduladores<sup>8</sup> y adoptando morfologías ameboides<sup>9</sup>. Estas alteraciones morfológicas se han asociado indirectamente a la fagocitosis; sin embargo, la actividad fagocítica microglial durante el infarto cerebral no se ha demostrado de forma directa. El grupo de investigación receptor, experto en fagocitosis microglial, ha demostrado que la fagocitosis es muy eficaz en condiciones fisiológicas, pero se altera en modelos murinos de epilepsia<sup>10</sup> y de infarto cerebral por oclusión de la arteria cerebral media (MCAo; Tesis doctoral Sol Beccari, defensa prevista 2020; **Figura 1. A**). Para estudiar los mecanismos bioquímicos y moleculares desencadenantes de este bloqueo de la fagocitosis microglial, en el presente trabajo hemos analizado el infarto cerebral en un sistema *in vitro* empleando un modelo de privación de oxígeno y nutrientes (OND).

**Metabolismo de la microglía fagocítica.** La modulación del metabolismo en respuesta a la fagocitosis es un fenómeno ya descrito en macrófagos y asociada a la **respuesta inmune entrenada**; la fagocitosis de  $\beta$ -glucano fúngico induce una reprogramación epigenética que produce un incremento de la glicólisis junto con una disminución de la fosforilación oxidativa dependiente de la vía **dectin-1/Akt/HIF1 $\alpha$** <sup>11</sup>. Sin embargo, el efecto de la actividad fagocítica en el propio metabolismo microglial es desconocido. Por ello, el grupo de investigación receptor realizó un análisis transcriptómico de la microglía fagocítica, revelando que tras la ingesta de células apoptóticas, la microglía presenta un programa transcriptómico donde la fosforilación oxidativa disminuye y la vía glicolítica aumenta (**Figura 1. A**)<sup>12</sup>, sugiriendo un efecto similar al dirigido por HIF1 $\alpha$  en macrófagos<sup>11</sup>. Precisamente, el factor de transcripción HIF1 $\alpha$  también se mostró incrementado en el análisis transcriptómico de la microglía fagocítica, señalando el potencial de la proteína HIF1 $\alpha$  como regulador maestro de la glicólisis en respuesta a la fagocitosis. En el presente trabajo hemos analizado el efecto de la fagocitosis microglial en la expresión de HIF1 $\alpha$ .



**Figura 1. A)** Bloqueo de la fagocitosis microglial en el modelo de infarto cerebral MCAo. Imágenes representativas del giro dentado hipocámpal por microscopía confocal. Ratones control (*Sham*), y tratados con oclusión de la arteria cerebral media (MCAo) durante 6 horas y 1 día; los núcleos se muestran en blanco (DAPI), la microglía en verde (EGFP) y los astrocitos en rojo (GFAP). Las flechas señalan células apoptóticas; en el control aparecen englobadas pero no así en los MCAo. Barra de escala 50  $\mu$ m. El hemisferio contralateral (CL) se empleó como control interno del tratamiento en el ipsilateral (IL). Cuantificación del índice fagocítico (porcentaje de células apoptóticas englobadas por la microglía). Utilizando el análisis ANOVA de una vía con el test posthoc Holm-Sidak, \*\* indica  $p < 0,01$  y \*\*\* indica  $p < 0,001$ . Las columnas representan la media  $\pm$  error estándar de la media. Sham 6h n=1, MCAo 6h n=5, Sham 1d n=3, MCAo 1d n=5. **B)** Representación de una célula de microglía fagocítica con su núcleo y una mitocondria. Presentamos un resumen de los genes metabólicos alterados significativamente en la microglía fagocítica respecto a microglía naïve a partir de los resultados de un análisis transcriptómico (n=3). El color verde indica sobreexpresión y el rojo una disminución de la expresión; el factor de transcripción HIF1 $\alpha$  se muestra sobreexpresado (en el núcleo, en verde).

**La hipótesis general** de este trabajo es que en las células microgliales existe una relación bidireccional entre la fagocitosis y el metabolismo: por un lado, las condiciones metabólicas (oxígeno y nutrientes) pueden perturbar la actividad fagocítica de la microglía, y por otro lado, la fagocitosis puede modular el metabolismo microglial.

### 3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es analizar la existencia de una relación bidireccional entre la fagocitosis y el metabolismo microglial. Por una parte, analizaremos el efecto del metabolismo en la fagocitosis (**Objetivo 1**), utilizando un modelo de privación de oxígeno y nutrientes (OND), ya que se ha

descrito como modelo *in vitro* de isquemia<sup>13</sup>. Por otra parte, analizaremos el efecto de la fagocitosis en el metabolismo de la microglía (**Objetivo 2**); en concreto, estudiaremos el efecto de la fagocitosis microglial en el factor de transcripción HIF1 $\alpha$ , puesto que es un potencial modulador del metabolismo microglial.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

**Ratones:** Todos los experimentos se realizaron con ratones de la cepa fms-EGFP (MacGreen, en fondo C57BL/6) en los que la microglía expresa el reportero fluorescente. Los ratones tuvieron acceso libre a comida y agua, y siguieron ciclos de luz:oscuridad 12h:12h. Todos los procedimientos cumplen con la Directiva Europea 2010/63/EU, y fueron aprobados por el Comité de Ética de la UPV/EHU (CEBA/205/2011, CEBA/206/2011, CEIAB/82/2011, CEIAB/105/2012).

**Cultivos primarios de microglía:** Los cultivos primarios de microglía se realizaron siguiendo el protocolo ya descrito y publicado en el laboratorio<sup>10,14</sup>. Se extrajeron cerebros de ratones fms-EGFP postnatales (P0-P1); se quitaron las meninges y se descartaron el bulbo olfatorio y el cerebelo. El resto del cerebro se homogeneizó mecánicamente mediante pipeta, y se digirió enzimáticamente con papaína (20 U/mL, Sigma), proteasa cisteína (Sigma) y desoxirribonucleasa (DNAsa, 150 U/ $\mu$ L, Invitrogen) durante 15 minutos a 37 °C. La suspensión celular resultante se filtró mediante filtros celulares de 40  $\mu$ m de nylon (Fisher) y se transfirió a tubos Falcon que contenían 5 mL de 20 % FBS (*Fetal Bovine Serum*, Gibco) en HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, HyClone). A continuación, la suspensión celular se centrifugó a 200g 5 minutos, y se resuspendió el precipitado en 1 mL DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco) suplementado con 10 % FBS y 1 % antibiótico/antimicótico (Gibco). Finalmente, se sembraron dos cerebros por flask de cultivos recubiertos con poli L-Lisina (15  $\mu$ L/mL, Sigma). El medio se enriqueció añadiendo el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, 5 ng/mL, Sigma), para promover la proliferación microglial. Se cambió el medio el día siguiente de la siembra, y a partir de entonces, cada 3-4 días. Al llegar a confluencia (a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, aproximadamente 14 días), se extrajo la microglía agitando el flask a 140 rpm, 37 °C, 4 horas. Se contaron las células aisladas y se sembraron en placas de 24 pocillos con cubres de cristal recubiertos de poli-L-Lisina a una concentración de 80.000 células/pocillo (para inmunofluorescencia) o en placas de 6 pozos a una densidad de 1.500.000 células/pozo (para Western Blot). La microglía se asentó, como mínimo durante 24 horas, antes de realizar cualquier experimento.

**Línea celular SH-SY5Y-Vampiro:** Como modelo de apoptosis para simular la fagocitosis fisiológica *in vitro*, se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y-Vampiro (Innoprot). Se crecieron como cultivos adherentes en flasks sin revestimiento y cubiertas de 10 mL DMEM, suplementado con 10 % FBS y 1 % antibiótico/antimicótico (todos los componentes procedentes de Gibco). Además, se le añadió 0,5 % geneticina (G418, ThermoFisher) con el objetivo de mantener el plásmido portador de la proteína fluorescente Vampiro (turboFP602) dentro de las neuronas. Al llegar a confluencia, se tripsinizaron y se resembraron con una dilución 1:3. Para los experimentos de fagocitosis, 24 horas antes al experimento se tripsinizaron células confluentes y se resembraron sin diluir. De esta manera, evitamos que al inducir apoptosis obtengamos agrupaciones de neuronas apoptóticas.

**Ensayo de fagocitosis *in vitro*:** La microglía primaria fue alimentada con neuronas SH-SY5Y-Vampiro apoptóticas. Las neuronas fueron tratadas con estaurosporina (3  $\mu$ M, 4 h, Sigma) para inducir apoptosis. Se recogieron únicamente las células flotantes y se cuantificaron en una cámara Neubauer empleando azul de tripano; se consideraron células apoptóticas aquellas que carecían de tinción, puesto que en estadios tempranos de apoptosis todavía se mantiene la integridad de la membrana. Se añadieron las neuronas apoptóticas a los cultivos de microglía primaria en diferentes proporciones (célula apoptótica:microglía 1:1 y 1:9) durante diferentes tiempos (1, 3 y 24 h). La condición de isquemia se simuló empleando un modelo de privación de oxígeno y nutrientes (OND, *Oxygen and Nutrient Deprivation*); para ello, se introdujeron las células en una cámara de hipoxia (Heraeus, 1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) con medio de OND (NaCl 130 mM, KCl 5.4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.8 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18 mM en H<sub>2</sub>O miliQ).

**Línea celular BV2:** Línea celular immortalizada de microglía murina, empleada para poner a punto la técnica de Western Blot y para transfectar las células. Se crecieron de la misma manera a la descrita para la línea celular SH-SY5Y-Vampiro, con la excepción de que no se añadió geneticina. Las células se sembraron 24 horas antes de realizar el experimento.

**Hipoxia:** Como control positivo de la expresión de HIF1 $\alpha$ , se simularon condiciones hipóxicas. Células BV2 (para Western Blot) o microglía primaria (para inmunofluorescencia) en medio desoxigenado con nitrógeno se introdujeron en la cámara de hipoxia durante 3 horas.

**Western Blot:** Las células de microglía fueron lisadas directamente en las placas de 6 pozos empleando el tampón de lisis RIPA (Sigma) con un cóctel de inhibidores de fosfatasa y proteasas (1:100, ThermoFisher). Las células fueron sonicadas durante 5 segundos y centrifugadas (10.000g, 10 minutos). La proteína fue cuantificada con el ensayo del ácido bicinconónico (BCA, ThermoFisher); el resultado fue leído mediante un lector de microplacas (Synergy HT, BioTek) empleando luz de 590 nm. Se cargaron 20  $\mu$ g de muestra desnaturalizada por  $\beta$ -mercaptoetanol en geles de poliacrilamida tris-glicina (14 %, ThermoFisher). La electroforesis se realizó a 120 V durante 90 minutos. La proteína se transfirió a membranas de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,45  $\mu$ m, ThermoFisher) empleando 220 mA durante 120 minutos. La transferencia fue verificada con la tinción Ponceau S (Sigma). Para la inmunodetección, las membranas se embebieron en tampón tris-salino con 0,1 % Tween 20 (Sigma) (TBS-T). El bloqueo se realizó en TBS-T con 5 % leche en polvo desnatada durante 1 hora. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-HIF1 $\alpha$  (1:1000, originado en conejo, Novus Biologicals) y anti- $\beta$ -actina (1:5000, originado en ratón, Sigma) en TBS-T con 4 % BSA a 4 °C en agitación durante toda la noche. La mañana siguiente, las membranas fueron incubadas con peroxidasa de rábano (HRP) conjugada a los anticuerpos secundarios anti-conejo (1:1000, Cell Signaling) y anti-ratón (1:1000, Cell Signaling) en TBS-T con 5 % leche en polvo desnatada a temperatura ambiente y en agitación, durante 1 hora. La señal de la proteína de interés se detectó empleando *Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (ThermoFisher) en un sistema de imagen ChemiDoc (BioRad). La intensidad de las bandas fue cuantificada midiendo la intensidad correspondiente a cada banda con el software ImageJ. Los valores de proteína HIF1 $\alpha$  de cada muestra se normalizaron con los de la  $\beta$ -actina.

**Transfección:** Se transfectaron células BV2 con Lipofectamina2000 (Thermo Fisher) encapsulando siRNA control (*Scrambled*, Thermo Fisher) o específico de HIF1 $\alpha$  (Sigma). Los siRNA se marcaron fluorescentemente con 6-FAM (6-Carboxifluoresceína, Thermo Fisher) empleando reactivos de marcaje (Thermo Fisher). La transfección se dejó durante 15 horas para que las células pudiesen interiorizar el siRNA. A continuación, expresaron sus contenidos celulares durante 24 horas hasta que se fijaron para observarlas por inmunofluorescencia.

**Inmunofluorescencia:** Las células se fijaron durante 10 minutos con 4 % paraformaldehído (PFA) y se transfirieron a PBS. Las células se bloquearon en solución bloqueo (0,1 % Triton X-100, 0,5 % albúmina de suero bovino (BSA) en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario en solución bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente: anti-EGFP para detectar microglía primaria (1:1000, originado en pollo, Aves Laboratories), antiCD11b para detectar células BV2 (1:200, originado en rata, Bio-Rad) y anti-HIF1 $\alpha$  (1:500, originado en conejo, Novus Biologicals). Las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario en solución bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente: 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para detectar núcleos (5 mg/mL, 1:1000, Sigma), cabra-anti-pollo-AlexaFluor488, cabra anti-rata-Alexa568 y cabra-anti-conejo-AlexaFluor647 (todos ellos 1:500, Jackson Immunoresearch). Las células se lavaron 3 veces con PBS y los cubreobjetos se montaron en portas utilizando medio de montaje *Fluorescent Mounting Medium* (DakoCytomation, Carpinteria, CA).

**Microscopía confocal:** Se obtuvieron 3 imágenes localizadas aleatoriamente en cada cubreobjetos con el microscopio confocal Leica TCS STED CW SP8 (Achucarro). Las células se observaron bajo un objetivo 40X en aceite de inmersión, paso en el eje Z de 0,7  $\mu$ m, velocidad 400 Hz y resolución 512x512 px (ejes XY). A partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal, las células apoptóticas se definieron en base a su morfología nuclear, analizada mediante tinción DAPI, cuando la cromatina se mostró condensada o fragmentada (picnosis o cariorrexis)<sup>10</sup>. La fagocitosis se definió como la formación de un bolsillo tridimensional englobando células apoptóticas<sup>14</sup>. Por ello, se clasificó como microglía fagocítica aquellas células en las que el marcador microglial (EGFP) co-localizó con el marcador nuclear (DAPI) o con el marcador de neuronas apoptóticas (SH-SY5Y-Vampiro).

**Análisis de la distribución celular de HIF1 $\alpha$ :** En las imágenes obtenidas por microscopía confocal, se delimitó manualmente la región que ocupaba el núcleo y la del perinúcleo con el software ImageJ. Las células se analizaron en el Z-stack de máxima intensidad de sus respectivos núcleos. Para delimitar la región nuclear, se definió el área del núcleo empleando el canal de DAPI (marcador nuclear). El cúmulo que se observaba adherido al núcleo se delimitó empleando el canal de HIF1 $\alpha$ , región que se denominó perinuclear. Finalmente, se midió la intensidad media correspondiente a HIF1 $\alpha$  en las regiones descritas.

**Análisis estadístico:** Se utilizó el programa SPSS para el análisis estadístico. Se realizaron pruebas de normalidad (test de Shapiro-Wilk) y de homocedasticidad (test de Levene) para poder realizar los análisis t-test o ANOVA. En todos los casos se realizaron test posthoc de Holm-Sidak para determinar significancia estadística entre grupos. Los resultados se presentan en gráficas cuyas columnas representan la media  $\pm$  error estándar de la media. Los valores  $p < 0,05$  se consideraron significativos.

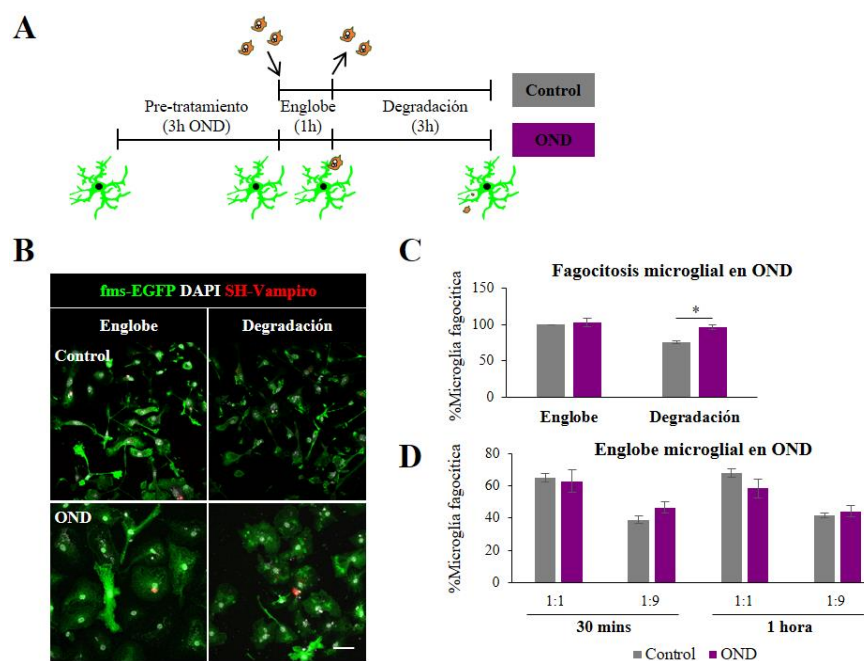
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efecto del metabolismo en la fagocitosis microglial.

El primer objetivo de este trabajo fue testar el efecto del metabolismo en la fagocitosis. Para ello, nos enfocamos más específicamente en un modelo de isquemia mediante la privación de oxígeno y nutrientes (OND), que modeliza *in vitro* la condición de isquemia que ocurre durante el infarto cerebral<sup>13</sup>.

#### 5.1.1. Análisis de la fagocitosis microglial en condiciones de OND.

El proceso de fagocitosis consta de dos acciones principales. En primer lugar, la microglía extiende sus prolongaciones y engloba el cargo formando un fagosoma; y en segundo lugar, el fagosoma converge en el lisosoma para la degradación del cargo<sup>15</sup>. Para testar la hipótesis de que la OND afecta a la fagocitosis (englobe y/o degradación) utilizamos un modelo *in vitro* de microglía primaria tratada con células SH-SY5Y-Vampiro apoptóticas. El modelo de OND consistió en tratar a las células con medio de OND en una cámara de hipoxia (1 % O<sub>2</sub>), mientras que los controles se mantuvieron con DMEM en el incubador (O<sub>2</sub> ambiental) (**Figura 2. A**). Para el experimento del englobe, la microglía fue pretratada durante 3 horas con OND o medio control antes de añadir las neuronas SH-SY5Y-Vampiro apoptóticas durante 1 hora (proporción célula apoptótica:microglía 1:1). Para el experimento de degradación, después de esa hora de fagocitosis, se retiraron las células SH-SY5Y-Vampiro y a la microglía se le permitió degradar el cargo durante 3 horas en medio control u OND. A continuación, cuantificamos el porcentaje de microglía fagocítica mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal (**Figura 2**). El porcentaje de microglía englobando el cargo se mantuvo estable en las células tratadas con OND (**Figura 2. B, C**). Sin embargo, apreciamos un bloqueo de la degradación microglial, disminuyendo significativamente en las células tratadas con OND (n=3). Por lo tanto, el tratamiento de OND, que modeliza el infarto cerebral por isquemia *in vitro*, induce un bloqueo de la degradación microglial. Este fenómeno podría explicar el bloqueo de la fagocitosis microglial que se observa *in vivo* en el modelo de infarto cerebral (**Figura 1. A**).



**Figura 2. Análisis de la fagocitosis microglial en OND.** A) Diseño experimental. Analizamos el englobe alimentando la microglía con neuronas apoptóticas durante 1 h (condiciones control u OND); para el análisis de la degradación, se retiraron las neuronas y la microglía pudo degradar el cargo durante 3 h (condiciones control u OND). Los grupos OND se pre-trataron con OND durante 3 horas. B) Imágenes representativas de microscopía confocal de microglía primaria fagocítica control y en OND. Barra de escala 30  $\mu$ m. La microglía se muestra en verde (fms-EGFP), las neuronas apoptóticas en rojo (SH-SY5Y-Vampiro) y los núcleos en blanco (DAPI). C) Bloqueo significativo de la degradación en la fagocitosis microglial en OND (n=3). D) Análisis del englobe microglial, las proporciones corresponden a célula apoptótica:microglía (1:1 y 1:9). Observamos diferencias no significativas (n=3). \* indica  $p < 0,05$  utilizando el análisis ANOVA de una vía con el test posthoc Holm-Sidak. Las columnas representan la media  $\pm$  error estándar de la media.



Para confirmar que el tratamiento OND carecía de efecto sobre el englobe, utilizamos condiciones experimentales menos óptimas. Analizamos el proceso de englobe alimentando la microglía con diferentes cantidades de células apoptóticas (proporciones célula apoptótica:microglía 1:1 y 1:9) durante dos tiempos (30 minutos y 1 hora). Tanto la variación de las proporciones entre células apoptóticas:microglía como los diferentes puntos temporales no reflejaron cambios significativos (**Figura 2. C**). De esta manera, demostramos que el tratamiento con OND afecta exclusivamente a la degradación microglial, permaneciendo invariable el englobe del cargo.

En conclusión, con el modelo de OND hemos detectado un bloqueo de la degradación microglial, pero no así el englobe de las células apoptóticas; la microglía se mostraba incapacitada para degradar el cargo fagocitado, acumulándolo dentro de la célula. Aunque las condiciones de isquemia *in vivo* son más complejas que *in vitro*, nuestros resultados demuestran que al menos parte del bloqueo de la fagocitosis que observamos en los modelos de isquemia *in vivo* se explica por la falta de oxígeno y nutrientes.

## **5.2. Efecto de la fagocitosis en el metabolismo celular.**

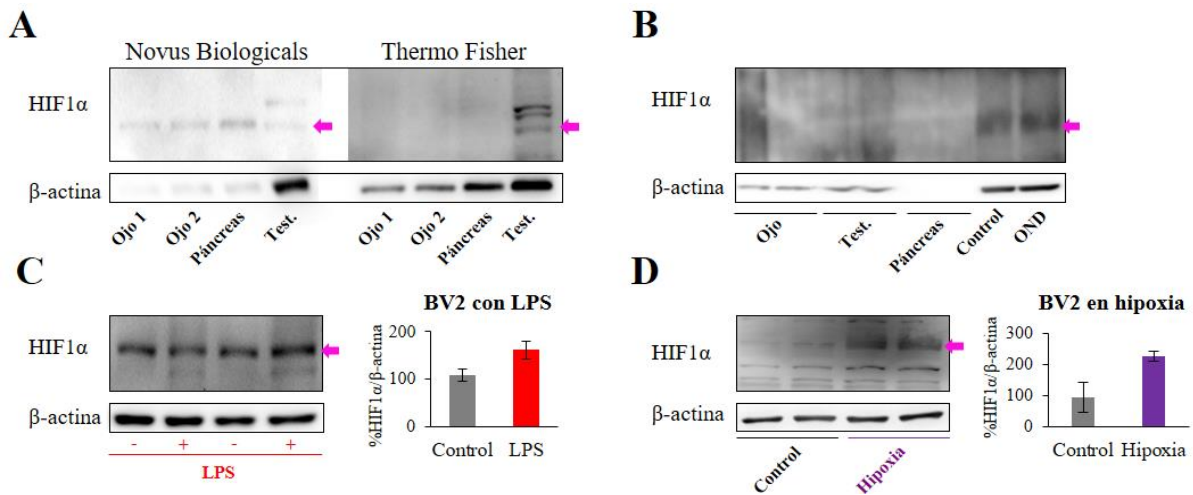
El segundo objetivo de este trabajo fue analizar el papel del factor de transcripción HIF1 $\alpha$  como regulador de la modulación del metabolismo microglial en respuesta a la fagocitosis. Nuestro primer objetivo específico fue la puesta a punto de la expresión de HIF1 $\alpha$  en respuesta a la fagocitosis utilizando Western Blot y microscopía confocal.

### **5.2.1. Puesta a punto del Western Blot.**

En la puesta a punto del análisis de HIF1 $\alpha$  por Western Blot, comparamos anticuerpos procedentes de dos casas comerciales (Thermo Fisher y Novus Biologicals) y optimizamos la concentración a emplear. Para ello, utilizamos diferentes controles positivos y negativos a partir de tejidos de ratón y células (línea microglial BV2 o cultivos de microglía primaria) con diferentes tratamientos.

Los tejidos de ratón a emplear como control se seleccionaron en base a la expresión de HIF1 $\alpha$  descrita en la base de datos [www.biogps.org](http://www.biogps.org); como control positivo utilizamos ojos, y como control negativo testículos y páncreas. Con estas muestras, comparamos los anticuerpos de Thermo Fisher y Novus Biologicals. El anticuerpo de Novus Biologicals permitió la detección de una banda del peso molecular esperado (100 kDa) en todas las muestras, pero no así el de Thermo Fisher, por lo que se continuó el análisis con el anticuerpo de Novus Biologicals (**Figura 3. A**). Para confirmar de manera más específica la inmunodetección de HIF1 $\alpha$  por Western Blot, analizamos la expresión de HIF1 $\alpha$  en células de la línea microglial BV2. Estas células fueron sometidas a OND, tratamiento que se ha descrito como inductor de este factor de transcripción<sup>16</sup>. En estas muestras detectamos una banda de 100 kDa utilizando el anticuerpo de Novus Biologicals, la cual corresponde al peso molecular esperado de HIF1 $\alpha$  (**Figura 3. B**). Sin embargo, en este experimento no detectamos cambios entre las células control y las tratadas con OND, y tampoco detectamos la banda esperada de HIF1 $\alpha$  en los tejidos control. Para confirmar la banda correspondiente a HIF1 $\alpha$ , analizamos su expresión en células BV2 en otros dos modelos en los que se ha descrito la inducción de esta proteína: tratamiento con lipopolisacáridos bacterianos (LPS)<sup>17</sup> durante 24 horas, e hipoxia<sup>18</sup> durante 3 horas. En estos

experimentos observamos múltiples bandas (**Figura 3. C, D**), posiblemente debido a las modificaciones postraduccionales a las que se somete nuestra proteína de interés fisiológicamente<sup>19</sup>. El tratamiento con LPS no produjo ningún efecto en la expresión de HIF1 $\alpha$ , pero el tratamiento con hipoxia sí produjo un incremento en la banda de HIF1 $\alpha$  (**Figura 3. C**; n=1). Por lo tanto, el tratamiento células microgliales BV2 con hipoxia se mostró como un potencial control positivo de la expresión de HIF1 $\alpha$ , aunque para confirmarlo habría que incrementar la potencia estadística y replicar estos resultados en experimentos independientes.

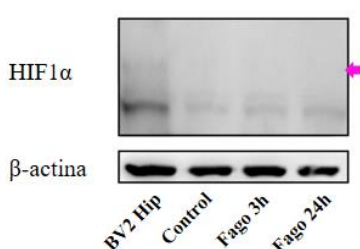


**Figura 3. Puesta a punto del análisis de HIF1 $\alpha$  mediante Western Blot.** **A)** Comparación entre los anticuerpos procedentes de Novus Biologicals y Thermo Fisher, concentración 1:500. Novus Biologicals permitió detectar una banda del peso molecular esperado (100 kDa). Como controles se utilizaron tejidos murinos (ojos como control positivo; el páncreas y el testículo como controles negativos). **B)** Análisis de tejidos murinos y células BV2 tratadas con OND durante 3 h con el objetivo de detectar HIF1 $\alpha$  específicamente. Solo se pudo detectar HIF1 $\alpha$  en las muestras celulares. **C) y D)** Aumento de HIF1 $\alpha$  en células BV2 mediante LPS 1  $\mu$ g/mL durante 24 h (**C**) e hipoxia durante 3 h (**D**). En ambos experimentos aumenta la intensidad de la banda de HIF1 $\alpha$ . La flecha rosa indica 100 kDa, peso molecular correspondiente a HIF1 $\alpha$ ; la banda de la  $\beta$ -actina se sitúa en 45 kDa. Los experimentos **B), C) y D)** se realizaron con el anticuerpo Novus Biologicals 1:1000. Las columnas representan la media  $\pm$  error estándar de la media. En todos los experimentos n=1.

### 5.2.2. Efecto de la fagocitosis en el factor de transcripción HIF1 $\alpha$ por Western Blot

Una vez puesta a punto la detección de HIF1 $\alpha$  por Western Blot con el modelo de hipoxia, testamos el efecto de la fagocitosis en el factor de transcripción HIF1 $\alpha$ . En este caso, empleamos microglía primaria para obtener las muestras de microglía fagocítica y control, puesto que fue el modelo utilizado para realizar el análisis transcriptómico que propone la proteína HIF1 $\alpha$  como regulador del metabolismo en condiciones fagocíticas (**Figura 1. B**). La microglía fagocítica fue alimentada con células SH-SY5Y-Vampiro apoptóticas durante 3 y 24 horas; como control utilizamos microglía primaria en DMEM; y como control positivo utilizamos la línea celular BV2 tratada con hipoxia durante 3 horas.

La microglía primaria no mostró ninguna banda en el peso molecular esperado (100 kDa), fenómeno que podría deberse a que HIF1 $\alpha$  tenga un peso molecular diferente en microglía primaria en comparación a la línea celular BV2 (**Figura 4**). No obstante, la banda de 100 kDa detectada en la línea celular BV2 era bastante tenue, por lo que habría que replicar el experimento.

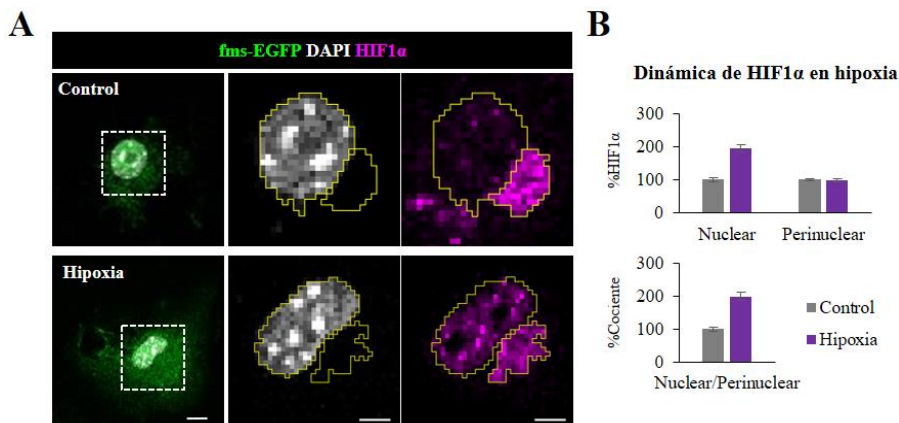


**Figura 4. Efecto de la fagocitosis en HIF1 $\alpha$ .** Detectamos una banda de 70 kDa. En el control positivo (línea celular BV2 en hipoxia durante 3 horas) detectamos una banda en el peso molecular esperado de 100 kDa (flecha rosa), pero no así en las muestras de microglía primaria control y fagocitosis durante 3 y 24 horas. La banda de la  $\beta$ -actina se sitúa en 45 kDa. Se empleó el anticuerpo Novus Biologicals 1:1000. n=1.

Teniendo en cuenta los problemas de la detección de HIF1 $\alpha$  por Western Blot (i.e., presencia de múltiples bandas, inconsistencia en el peso molecular de la banda detectada), que dificultarían la detección de HIF1 $\alpha$  en la microglía fagocítica, procedimos utilizando la microscopía confocal como técnica alternativa para la detección de HIF1 $\alpha$ .

### 5.2.3. Puesta a punto de la microscopía confocal

Como técnica alternativa para la detección de HIF1 $\alpha$  utilizamos microscopía confocal con el mismo anticuerpo de Novus Biologicals. En la microglía primaria control observamos que la expresión de HIF1 $\alpha$  se distribuía entre el núcleo, posiblemente asociado a su función como factor de transcripción; y un cúmulo perinuclear no descrito previamente pero que posiblemente esté relacionado con su síntesis en el retículo endoplásmico (**Figura 5**). Nuevamente utilizamos el modelo de hipoxia para poner a punto la detección de los cambios en la expresión de HIF1 $\alpha$ . En estos experimentos empleamos microglía primaria en vez de la línea microglial BV2, ya que los cultivos primarios modelizan mejor la microglía *in vivo*<sup>20</sup>. En condiciones de hipoxia, observamos la translocación de HIF1 $\alpha$  al núcleo: la intensidad media nuclear se duplicó, y la perinuclear se mantuvo estable. De esta manera, el cociente entre la intensidad media obtenida en el núcleo y la del perinúcleo también se duplicó (**Figura 5**). Por tanto, el tratamiento de hipoxia se reafirmó como control positivo robusto en este experimento (n=1), induciendo la translocación de la proteína HIF1 $\alpha$  al núcleo, donde ejerce su función de factor de transcripción. No obstante, para poder analizarlo estadísticamente, habría que confirmar este experimento (n=1) con otros independientes.

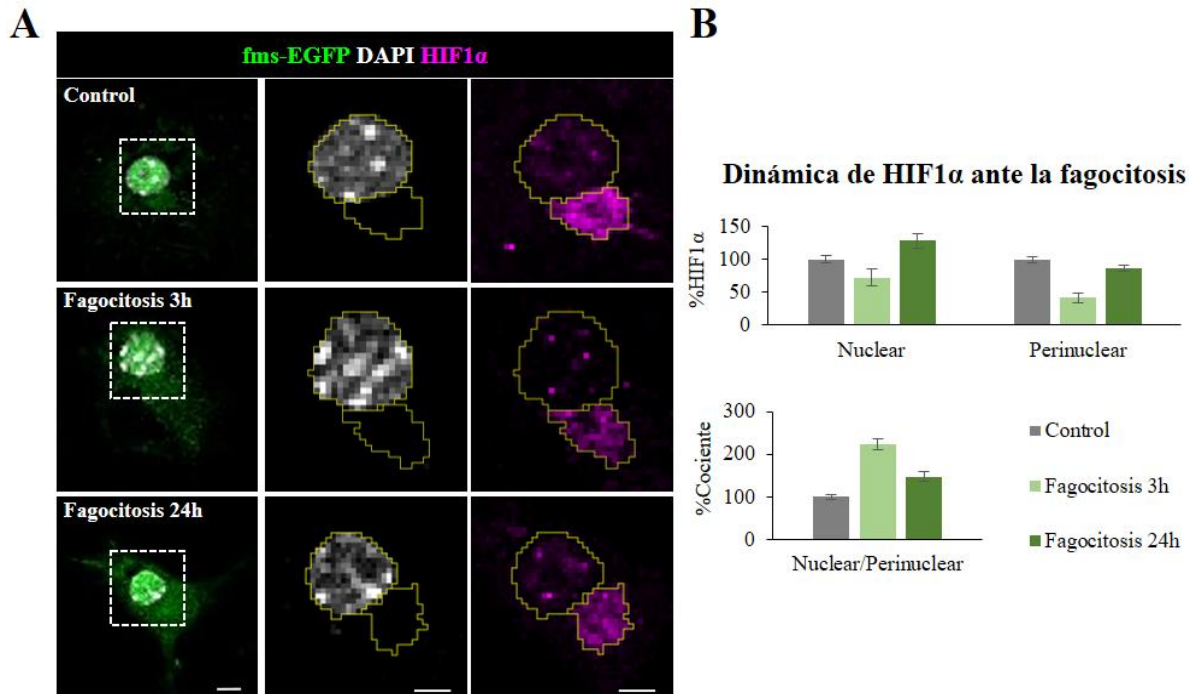


**Figura 5. La hipoxia induce la translocación de HIF1 $\alpha$  al núcleo.** **A)** Imágenes de microscopía confocal de microglía primaria control e hipoxia durante 3 horas. La microglía se muestra en verde (fms-EGFP), los núcleos en blanco (DAPI) y la proteína HIF1 $\alpha$  en magenta. Barra de escala 10  $\mu$ m (columna de la izquierda) y 3  $\mu$ m (columnas de la derecha). **B)** Cuantificación de la intensidad media de HIF1 $\alpha$  en el área nuclear, en el cúmulo perinuclear y el cociente entre núcleo y perinúcleo (Nuclear/Perinuclear). En condiciones de hipoxia se observa una translocación de HIF1 $\alpha$  al núcleo, pero sin cambiar la intensidad media perinuclear. Las columnas representan la media  $\pm$  error estándar de la media, n=1.

### 5.2.4. Efecto de la fagocitosis en el factor de transcripción HIF1 $\alpha$ por microscopía confocal

La puesta a punto de la detección de HIF1 $\alpha$  por microscopía confocal en el modelo de hipoxia permitió proceder a analizar la dinámica que mostraba HIF1 $\alpha$  en microglía fagocítica. Mediante microscopía confocal, detectamos un aumento del cociente nuclear/perinuclear en la microglía fagocítica a las 3 horas; este aumento se debía a que la intensidad perinuclear disminuía más que la nuclear (**Figura 6**). Por tanto, a las 3 horas de fagocitosis no observamos una translocación de HIF1 $\alpha$  al núcleo. Sin embargo, en la microglía fagocítica a las 24 horas observamos un aumento del cociente nuclear/perinuclear debido al aumento de la intensidad nuclear y la reducción de la intensidad perinuclear en comparación con el control. Este resultado

refleja la translocación al núcleo de la proteína HIF1 $\alpha$  en la microglía fagocítica a las 24 horas. Por lo tanto, debido a que la translocación al núcleo solo se observó a las 24 horas, podría ser que HIF1 $\alpha$  ejerciera de regulador del metabolismo a las 24 horas, y no así a las 3 horas. No obstante, teniendo en cuenta que contamos con un único experimento (n=1), para poder afirmar un efecto de la fagocitosis a las 24 horas, los resultados deberían replicarse con experimentos independientes que permitan su análisis estadístico.



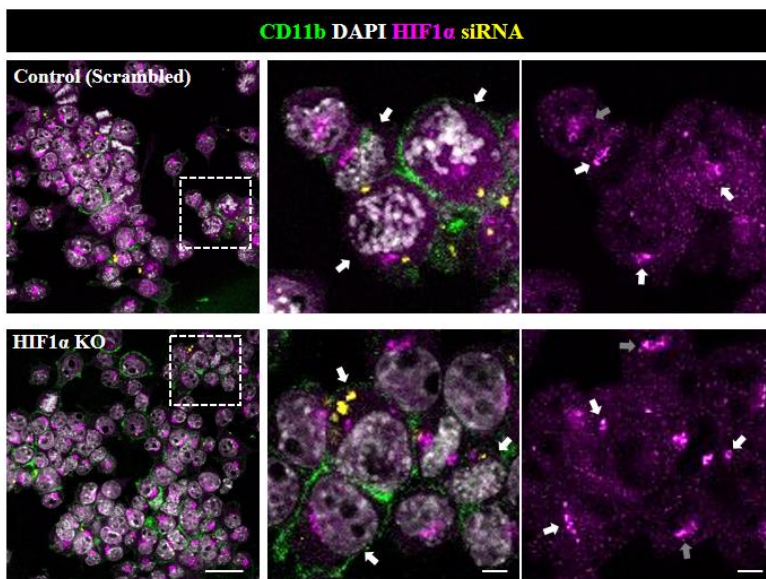
**Figura 6. Análisis de la localización de HIF1 $\alpha$  en respuesta a la fagocitosis microglial.** A) Imágenes de microscopía confocal de microglía primaria control y fagocítica (3 y 24 horas). La microglía se muestra en verde (fms-EGFP), los núcleos en blanco (DAPI) y la proteína HIF1 $\alpha$  en magenta. Barra de escala 10  $\mu$ m (columna izquierda) y 3  $\mu$ m (columna derecha). B) Cuantificación de la intensidad media de HIF1 $\alpha$  en el área nuclear, en el cúmulo perinuclear y el cociente nuclear/perinuclear. Se observa un efecto bifásico: a las 3 horas todavía no se aprecia la translocación de HIF1 $\alpha$  al núcleo, pero sí a las 24 horas. Las columnas representan la media  $\pm$  error estándar de la media, n=1.

En resumen, pusimos a punto las técnicas de Western Blot y el análisis de imagen por microscopía confocal con el objetivo de analizar la expresión del factor de transcripción HIF1 $\alpha$  en respuesta a la fagocitosis. El tratamiento de células microgliales con hipoxia durante 3 horas resultó ser un control positivo robusto, aumentando la intensidad de la banda de 100 kDa en Western Blot y presentando una clara translocación al núcleo en el análisis por microscopía confocal. Respecto a la microglía fagocítica, mediante microscopía confocal observamos la translocación al núcleo con efecto retardado, ya que solo se aprecia a las 24 horas. De esta manera, es posible que la fagocitosis module el metabolismo microglial mediante HIF1 $\alpha$ , ya que el incremento de HIF1 $\alpha$  puede fomentar un metabolismo glicolítico<sup>17</sup>. No obstante, debemos repetir nuestros experimentos para determinar si realmente la fagocitosis incrementa la expresión de la forma activa de HIF1 $\alpha$  (100 kDa, localización nuclear). Además, se debe validar si el anticuerpo empleado reconoce la forma activa de HIF1 $\alpha$  específicamente.

### 5.2.5. Verificación de la especificidad del anticuerpo Novus Biologicals.

Con el objetivo de comprobar de manera más específica la selectividad del anticuerpo por la proteína HIF1 $\alpha$ , utilizamos una estrategia de depleción de HIF1 $\alpha$  con siRNAs en células BV2. Empleamos la línea celular

BV2 debido a la dificultad de transfectar microglía primaria, y siRNAs fluorescentes (marcados con el fluoróforo FAM) específicos para anti-HIF1 $\alpha$ . Como control se utilizó un siRNA con secuencia aleatoria (*Scrambled*) y se visualizó la localización intracelular tanto de la proteína HIF1 $\alpha$  como del siRNA mediante microscopía confocal. La eficiencia de la transfección fue baja e insuficiente, ya que pocas células mostraron marcaje del siRNA en el citoplasma. Además, la distribución de HIF1 $\alpha$  permaneció invariable independientemente de si las células estaban transfectadas o no (**Figura 7**), lo que sugiere o bien a que el siRNA no funcionó, o bien a que el anticuerpo marcaba de manera no específica proteínas que no son HIF1 $\alpha$ . Por lo tanto, la transfección no desveló la especificidad del anticuerpo, existiendo la posibilidad de que detectemos otras proteínas inespecíficamente.



**Figura 7. Especificidad del anticuerpo contra HIF1 $\alpha$ .** Imagen de microscopía confocal de células microgliales BV2 (en verde, CD11b) transfectadas con siRNA fluorescentes (amarillo, FAM Dye) control (*Scrambled*) y específico de HIF1 $\alpha$ . Los núcleos se muestran en blanco (DAPI), y la proteína HIF1 $\alpha$  en magenta. La transfección resultó insuficiente, como se muestra en una pequeña población representativa. Barra de escala 30  $\mu$ m. En las imágenes ampliadas observamos que las células siguieron expresando el factor de transcripción aún con el siRNA-HIF1 $\alpha$  interiorizado. Las flechas blancas señalan células que han sido transfectadas con el siRNA pero tienen similar expresión de HIF1 $\alpha$  que células circundantes no transfectadas; en la columna de la derecha se señala la región perinuclear que permanece invariable en células transfectadas. Las flechas grises señalan células no transfectadas. Barra de escala 5  $\mu$ m.

La posibilidad de que el anticuerpo empleado sea inespecífico implica que los resultados obtenidos tanto mediante Western Blot como mediante microscopía confocal puedan representar proteínas diferentes a HIF1 $\alpha$ . Por ello, con el objetivo de demostrar la fiabilidad de los experimentos hasta este punto, se debe verificar si realmente hemos empleado un anticuerpo inespecífico o si el siRNA transfectado no reconoce como debería la secuencia correspondiente a HIF1 $\alpha$  para su depleción.

## 6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, hemos analizado por primera vez la relación bidireccional entre la fagocitosis y el metabolismo en células microgliales.

### **La falta de oxígeno y nutrientes bloquea la fagocitosis microglial**

Hemos demostrado que la privación de oxígeno y nutrientes *in vitro* bloquea la fagocitosis microglial, similar al bloqueo que habíamos observado *in vivo* tras MCAo (**Figura 1. A**). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que en el complejo proceso de isquemia que ocurre *in vivo*, la privación de oxígeno y nutrientes son suficientes por sí mismos para bloquear la fagocitosis microglial. Estos resultados están en aparente



contradicción con estudios recientes donde basándose en análisis indirectos (principalmente atribuyendo morfologías ameboides a la fagocitosis), se describe un aumento de la fagocitosis en el infarto cerebral por isquemia<sup>7,9</sup>. Sin embargo, no existe una relación entre la función microglial y su morfología, ya que la microglía ramificada también presenta actividad fagocítica en condiciones fisiológicas, o se muestra hipertrófica en inflamación aguda<sup>21</sup>. Por tanto, para poder describir la fagocitosis microglial se debe observar y cuantificar directamente la microglía<sup>22</sup>. En el presente trabajo, por primera vez hemos estudiado de forma directa la actividad fagocítica de la microglía en el infarto cerebral por isquemia, observando un bloqueo en la degradación no descrito hasta ahora.

Las condiciones de isquemia han mostrado perturbar únicamente el proceso de degradación, sin mostrar indicios de alterar la acción de englobar de la microglía fagocítica; sin embargo, los resultados del sistema MCAo *in vivo* sugieren un bloqueo del englobe, ya que la microglía no muestra restos de células apoptóticas (Tesis doctoral Sol Beccari). Una posible explicación a esta discrepancia, es que en los sistemas *in vivo* el bloqueo de la fagocitosis dependa de la integración tisular y sistémica (i.e., comunicación con otros tipos celulares, interacción con la matriz extracelular, gradientes quimiotácticos)<sup>3</sup>, condiciones que no se producen *in vitro*. Por lo tanto, el efecto del infarto cerebral por isquemia en la microglía podría ser multifactorial, donde además de la privación de oxígeno y nutrientes, factores externos a la microglía (i.e., excitotoxicidad) inducen un bloqueo de la fagocitosis.

El bloqueo de la degradación fagocítica observado en el sistema *in vitro* puede ser debido a distintos mecanismos celulares, como la inducción de autofagia a modo de respuesta protectora durante la OND; o la alteración del pH lisosomal. La **autofagia** es un proceso conservado evolutivamente para reciclar material intracelular, que tiene gran similitud con la fagocitosis<sup>23</sup>. Tanto el autofagosoma como el fagosoma convergen en el lisosoma, donde degradan el cargo con el objetivo de mantener la homeostasis celular y tisular, por lo que podría existir una competición excluyente por los recursos intracelulares<sup>24</sup>. De hecho, en macrófagos murinos se ha demostrado un efecto inhibitorio reversible de la autofagia sobre la fagocitosis, confirmando una correlación directa entre la inducción de autofagia y la inhibición de la fagocitosis<sup>25</sup>. Además, la autofagia se induce como respuesta protectora durante la OND<sup>26</sup>, por lo que especulamos que el bloqueo de la degradación fagocítica podría ser consecuencia del efecto inhibitorio que ejerce la autofagia sobre la fagocitosis. Otro mecanismo posible para explicar la menor degradación del cargo durante la OND podría ser la alteración del **pH lisosomal**, puesto que el pH ácido de los lisosomas permite la actividad de enzimas degradativas como por ejemplo las enzimas hidrolasas ácidas o las proteasas<sup>27</sup>. Considerando que se ha descrito que la perturbación de esta acidificación lisosomal altera la capacidad fagocítica en los macrófagos<sup>28</sup>, especulamos un pH sub-óptimo como consecuencia de la OND podría ser el desencadenante del bloqueo de la degradación fagocítica.

En resumen, los resultados demuestran que la actividad fagocítica de la microglía está bloqueada en el infarto cerebral por isquemia, lo que puede causar un estado prolongado de inflamación empeorando la propia enfermedad<sup>10</sup>. El control y la modulación de la fagocitosis microglial podría regular el daño tisular, e incluso puede resultar en una estrategia terapéutica para acelerar la recuperación cerebral, por lo que será de gran interés describir el mecanismo desencadenante del bloqueo fagocítico en condiciones de isquemia.

### **La fagocitosis induce cambios sutiles en la proteína HIF1 $\alpha$**

En el presente trabajo hemos observado que la fagocitosis afecta a la expresión factor de transcripción HIF1 $\alpha$  de manera sutil a las 24 horas. De esta manera, el claro efecto de la fagocitosis en la expresión de HIF1 $\alpha$  ocurre a nivel de ARN (**Figura 1. B**), pero teniendo en cuenta que no detectamos un cambio tan drástico a nivel proteico, posiblemente el efecto se normalizase al llegar a la proteína (i.e., por mecanismos de traducción o regulación a los que se somete la proteína fisiológicamente)<sup>19</sup>. Por lo tanto, la fagocitosis induce la transcripción de HIF1 $\alpha$ , pero no ejerce efectos notorios a nivel proteico. No obstante, el cambio en la expresión de HIF1 $\alpha$  en respuesta a la fagocitosis es tan delicado, que debería analizarse con técnicas alternativas a las empleadas en este trabajo (i.e., preparación de las muestras mediante extracción nuclear para enriquecer la forma activa de HIF1 $\alpha$ ). Aun así, si se confirma la especificidad del anticuerpo empleado y si aumentando el tamaño de la muestra experimental se demuestra la existencia de un efecto de la fagocitosis en HIF1 $\alpha$ , un pequeño incremento podría ser suficiente para modular el metabolismo microglial, puesto que su cascada de señalización amplifica la señal exponencialmente<sup>29</sup>. Llegados a ese punto, quedaría por elucidar la relevancia de HIF1 $\alpha$  en el metabolismo microglial; si la fagocitosis modula el metabolismo de la microglía y si es HIF1 $\alpha$  el regulador maestro que desencadena ese proceso.

El incremento en la expresión de HIF1 $\alpha$  que observamos ocurre en las primeras 24 horas. Sin embargo, la remodelación metabólica descrita en macrófagos como consecuencia de la respuesta inmune entrenada no es clara hasta pasados 7 días, cuando el metabolismo de los macrófagos es altamente glicolítico<sup>11</sup>. Por ello, los resultados reportados en el presente trabajo podrían ser el preludio de un cambio metabólico microglial, mostrando todavía cambios sutiles al ser un estado muy temprano. Para poder analizar la existencia de una remodelación metabólica en la microglía en respuesta a la fagocitosis, resultaría de gran interés analizar tanto el metabolismo como la expresión de HIF1 $\alpha$  en microglía fagocítica a puntos temporales más tardíos (i.e., 7 días). Por ello, sería interesante analizar el metabolismo de microglía primaria fagocítica; una modulación metabólica que corrobore el análisis transcriptómico reflejaría la necesidad de analizar el factor de transcripción HIF1 $\alpha$ , puesto que en caso de que actúe como regulador maestro, sería una potencial diana terapéutica.

En resumen, el factor de transcripción HIF1 $\alpha$  es un importante candidato como regulador maestro del metabolismo microglial en respuesta a la fagocitosis, y que podría reflejar la existencia de una respuesta inmune entrenada, fenómeno no descrito en la microglía actualmente<sup>11</sup>. Por ello, se debe optimizar su análisis mediante técnicas alternativas y analizar la existencia de un cambio metabólico en la microglía. La regulación del metabolismo en respuesta a la fagocitosis por parte de HIF1 $\alpha$  nos aportaría una diana terapéutica muy interesante.

### **Relación bidireccional entre la fagocitosis y el metabolismo microglial**

En conclusión, la existencia de una relación bidireccional entre el metabolismo y la fagocitosis proporcionaría una nueva perspectiva para un mayor entendimiento de las funciones microgliales, lo que se podría emplear para regular una de las actividades (i.e., metabolismo o fagocitosis) mediante la monitorización de la otra función. Por una parte, hemos descrito que las condiciones de isquemia bloquean la actividad fagocítica microglial, lo que demuestra una dependencia de la fagocitosis sobre el metabolismo

celular. Estos resultados podrían sugerir el metabolismo microglial (i.e., requerimientos metabólicos) como diana para la modulación de la actividad fagocítica, la cual se ha descrito alterada en diversas enfermedades<sup>10</sup>. Por otra parte, la fagocitosis induce cambios sutiles en el factor de transcripción HIF1 $\alpha$ , pero desconocemos el impacto que pueda tener en el metabolismo de la microglía. Para poder completar el presente trabajo, se deberá estudiar en más profundidad la posibilidad de que exista una relación bidireccional entre el metabolismo y la fagocitosis.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Galloway, D. A., Phillips, A. E. M., Owen, D. R. J. & Moore, C. S. Phagocytosis in the Brain: Homeostasis and Disease. *Front. Immunol.* (2019). **10**(4), 790-805.
2. Smolders, S. M. T. *et al.* Microglia: Brain cells on the move. *Progress in Neurobiology.* (2019) **178**(14), 1016-1032.
3. Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A. & Neumann, H. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front. Cell. Neurosci.* (2013). **7**(6), 3389-3411.
4. Janda, E., Boi, L. & Carta, A. R. Microglial Phagocytosis and Its Regulation: A Therapeutic Target in Parkinson's Disease *Front. Mol. Neurosci.* (2018). **11**(144), 241-249.
5. Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends in Neurosciences.* (1999). **22**(9), 391-397.
6. Feigin, V. L., Lawes, C. M. M., Bennett, D. A. & Anderson, C. S. Stroke epidemiology: A review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurology.* (2003). **2**(1), 43-53.
7. Taylor, R. A. & Sansing, L. H. Microglial Responses after Ischemic Stroke and Intracerebral Hemorrhage. *Clin. Dev. Immunol.* (2013). **20**(13), 746068-746078.
8. Chhor, V. *et al.* Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia In vitro. *Brain. Behav. Immun.* (2013). **32**(1), 70-85.
9. Guruswamy, R. & Elali, A. Complex roles of microglial cells in ischemic stroke pathobiology: New insights and future directions. *International Journal of Molecular Sciences.* (2017). **18**(3), 496-512.
10. Abiega, O. *et al.* Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling. *PLoS Biol.* (2016). **14**(5), e1002554-1002602.
11. Cheng, S. C. *et al.* mTOR- and HIF-1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science.* (2014). **345**(6204), 6204-6222.
12. Diaz-Aparicio, I. *et al.* Microglia actively remodels adult hippocampal neurogenesis through the phagocytosis secretome. *bioRxiv*583849 (2019).
13. Holloway, P. M. & Gavins, F. N. E. Modeling Ischemic Stroke In Vitro: Status Quo and Future Perspectives. *Stroke.* (2016). **42**(2), 561-569.
14. Beccari, S., Diaz-Aparicio, I. & Sierra, A. Quantifying Microglial Phagocytosis of Apoptotic Cells in the Brain in Health and Disease. *Curr. Protoc. Immunol.* (2018). **122**(1), 49-86.
15. Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. & Haslett, C. A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Reviews Immunology.* (2002). **2**(12), 965-975.
16. Ruscher, K. *et al.* Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci. Lett.* (1998). **254**(2), 117-120.
17. Blouin, C. C., Pagé, E. L., Soucy, G. M. & Richard, D. E. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: Implication of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Blood* (2004).



**103**(3), 1124-1130.

18. Huang, T. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  upregulation in microglia following hypoxia protects against ischemia-induced cerebral infarction. *Neuroreport* (2014). **25**(14), 1122-1128.
19. Brahimi-Horn, C., Mazure, N. & Pouyssegur, J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  requires multiple posttranslational modifications. *Cellular Signalling* (2005). **17**(1), 1-9.
20. Timmerman, R., Burm, S. M. & Bajramovic, J. J. An Overview of in vitro Methods to Study Microglia. *Front. Cell. Neurosci.* (2018). **12**(1), 242-254.
21. Sierra, A. *et al.* Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell.* (2010). **7**(4), 483-495.
22. Diaz-Aparicio, I., Beccari, S., Abiega, O. & Sierra, A. Clearing the corpses: Regulatory mechanisms, novel tools, and therapeutic potential of harnessing microglial phagocytosis in the diseased brain. *Neural Regeneration Research.* (2016). **11**(10), 1533-1551.
23. King, J. S. Autophagy across the eukaryotes: Is *S. cerevisiae* the odd one out? *Autophagy.* (2012). **8**(7), 1159-1162.
24. Plaza-Zabala, A., Sierra-Torre, V. & Sierra, A. Autophagy and microglia: Novel partners in neurodegeneration and aging. *International Journal of Molecular Sciences.* (2017). **18**(3), 598-626.
25. Lima, J. G. B. *et al.* Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2011). **405**(4), 604-609.
26. Shang, L. *et al.* Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2011). **108**(12), 4788-4793.
27. Hesketh, G. G., Wartosch, L., Davis, L. J., Bright, N. A. & Luzio, J. P. The Lysosome and Intracellular Signalling. *Progress in molecular and subcellular biology.* (2018). **57**(1), 151-180.
28. Ip, W. K. E. *et al.* Phagocytosis and Phagosome Acidification Are Required for Pathogen Processing and MyD88-Dependent Responses to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* (2010). **184**(12), 7071-7081.
29. Masoud, G. N. & Li, W. HIF-1 $\alpha$  pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* (2015). **5**(5), 378-389.