



PEDECIBA

Área Biología, Sub-área Genética

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

**DAÑO GENÉTICO PRIMARIO, RESPUESTA CELULAR Y
MODULACIÓN DE LA COMUNICACIÓN ASTROCITARIA
ANTE EXPOSICIÓN AGUDA A ETANOL Y/O
CORTICOSTERONA**

Magíster en Ciencias Ana Laura Reyes Ábalos

Departamento de Genética

Departamento de Neurobiología y Neuropatología (NBNP)

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Orientadora: Dra. María Vittoria Di Tomaso

Co-orientadora: Dra. Silvia Olivera-Bravo

RESUMEN

Los astrocitos son las células gliales responsables de la homeostasis del sistema nervioso central. Sin embargo, en casos de injuria, pueden dañar las demás células neurales y causar neurodegeneración. En este marco, el daño en astrocitos hipocampales se ha asociado a alteraciones de los procesos de memoria y aprendizaje, déficit cognitivo, desarrollo y mantenimiento de adicción al alcohol, la respuesta patológica al estrés (CTS como hormona asociada al estrés) con repercusión en la salud general, trastornos del estado de ánimo y otros problemas psiquiátricos. Su diversidad funcional incluye un extenso repertorio de señalización de vesículas extracelulares (VEs) y nanotubos (NTs) involucrados tanto en mecanismos de protección como daño celular, tal cual lo demuestran varios paradigmas experimentales. Sin embargo, no se cuenta con información sobre el daño inducido en su genoma asociado a la cascada de eventos celulares de respuesta (DDR, *DNA damage response*) y su influencia en el repertorio comunicacional mediado por EVs y NTs. Por tanto, a efectos de abordar estos aspectos en astrocitos hipocampales murinos, implementamos cultivos primarios y los expusimos 1 h a etanol (EtOH, 400 mmol/L), asociado o no al glucocorticoide corticosterona (CTS, 1 μ mol/L). Mediante inmunomarcación y microscopía confocal evaluamos la respuesta inmediata en términos de daño inducido en el ADN nuclear: señales γ H2AX (H2AX fosforilada en Serina 139 que evidencia tempranamente en la cromatina los sitios de daño) y desencadenamiento inmediato de la DDR: señales de Ciclina D1 (proteína del control del ciclo celular, involucrada en la detención del ciclo celular que permite reparar las lesiones); señales de APE1 (endonucleasa implicada en la vía de reparación por escisión de nucleótidos, BER y en funciones citoplasmáticas antiinflamatorias); señales de BAX (proteína pro-apoptótica de la vía apoptótica intrínseca). Asimismo, se analizaron las características morfológicas del núcleo (DAPI) y citoplasma de los astrocitos, las señales de GFAP, S100 β (marcadores de estirpe celular) y faloidina (citoesquelos de actina F), así como H3K27m3 (marca de heterocromatina), H3K4m3 (marca de eucromatina) y ribonúcleo-proteína específica del nucléolo, a fin de detectar y cuantificar los nucléolos y revelar signos de reactividad o muerte celular. Mediante microscopía electrónica de barrido, se exploró la superficie astrocitaria para analizar la frecuencia y las características de los NTs y las VEs. Los astrocitos tratados mostraron una rápida inducción de un daño significativo en el ADN y el desencadenamiento de la DDR, con detención del ciclo celular, activación del BER e incremento de la señal de BAX, sin signos morfológicos de apoptosis, ni reactividad típica. Sin embargo, el incremento de nucléolos, los cambios en el repertorio de ETs y VEs sugieren modificaciones funcionales que podrían corresponder al inicio de una respuesta similar a la reactividad. A pesar de que clásicamente la DDR fue considerada un conjunto de vías que operan esencialmente a nivel nuclear y mitocondrial, pensamos que las células responderían como un sistema integrado, modulando diferentes procesos que protegen su supervivencia y la del organismo que integran. Futuros experimentos permitirán identificar los mecanismos subyacentes a los cambios observados y el efecto sobre la supervivencia neuronal y el mantenimiento de la homeostasis cerebral.

AGRADECIMIENTOS

1. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE-MEC)
2. Facultad de Ciencias
3. Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)
4. Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)
Beca Nacional de Doctorado
5. Sociedad Uruguaya de Genética (SUG)
6. ALAMCTA
7. Daniela Agratti (Facultad de Ciencias)
8. Tutoras María Vittoria Di Tomaso y Silvia Olivera Bravo
9. Colegas, técnicos y compañeros de trabajo
10. Familia y amigos

ÍNDICE

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

RESUMEN	3
AGRADECIMIENTOS	4
INTRODUCCIÓN	7
Daño genético y respuesta celular	7
Daño genético y respuesta celular en el sistema nervioso	14
¿EtOH y CTS son sustancias con potencial genotóxico?	16
Corticosterona, la hormona del estrés en murinos (CTS)	16
Daño genético y respuesta de los astrocitos.....	18
Activación astrocitaria.....	21
Fundamentación del problema de investigación	23
Problema de investigación	24
Hipótesis	24
Objetivo general	24
Objetivos específicos	25
MATERIALES y MÉTODOS	26
RESULTADOS	35
Activación de la DDR tras la incubación con EtOH y/o CTS	40
CICLINA D1.....	40
APE1	44
BAX	46
Análisis del estado de activación de los astrocitos	48
GFAP	48
S100 β	50
Citoesqueleto de actina evaluado con phalloidina	52
Evaluación del número de nucléolos	54
Modulación de la comunicación astrocitaria vía nanotubos (NTs) y vesículas extracelulares (VEs)	56
Nanotubos.....	56
Vesículas extracelulares	58
Vesículas extracelulares en Nanotubos	65
DISCUSIÓN	70
Paradigma experimental, fortalezas, debilidades y hallazgos	70
Daño inducido en el ADN tras exposiciones breves a EtOH y/o CTS.....	72

Activación de la DDR tras la incubación con EtOH y/o CTS.....	74
Análisis del estado de activación de los astrocitos tras la incubación con EtOH y/o CTS.....	77
Modulación de la comunicación astrocitaria vía nanotubos (NTs) y vesículas extracelulares (VEs).....	79
CONSIDERACIONES FINALES	82
PERSPECTIVAS	83
BIBLIOGRAFÍA	84

INTRODUCCIÓN

Daño genético y respuesta celular

El genoma de todos los organismos se ve desafiado continuamente por una variedad de agresiones genotóxicas (Srinivas et al., 2019) que inducen daño en bases nitrogenadas, aductos y/o roturas de cadena de ADN monocatenarias (SSB: *single strand breaks*) y bicatenarias (DSB: *double strand breaks*). Las DSB son el tipo de daño más letal, su reparación ineficiente o inexacta conduce a generar mutaciones cromosómicas e inestabilidad genómica. Las lesiones de causa exógena pueden originarse por exposición a contaminantes químicos, físicos (radiación ionizante, agentes radiomiméticos, radiación ultravioleta) y/o biológicos (virus, bacterias) que pueden incorporarse al organismo por diferentes vías (cutánea, respiratoria, oral, urinaria, intravenosa). Las lesiones de origen endógeno derivan de productos originados durante el metabolismo oxidativo de las células. Cualquier proceso que incremente el metabolismo celular, podría originar ROS que conducen a oxidación de las bases nitrogenadas, SSB y DSB (Lindahl et al., 1993; Van Loon, Markkanen & Hübscher, 2010; Yuan, Adamski & Chen, 2010; Caldecott, 2022).

Para evitar las consecuencias del daño genético, las células activan un conjunto de mecanismos evolutivamente conservados que se conocen en su conjunto como respuesta al daño del ADN (DDR: *DNA damage response*). Los mecanismos que emplea la DDR permiten que las células detecten el daño en el ADN, propaguen las señales de daño y activen cascadas de señalización que permiten modular la progresión del ciclo celular a nivel de puntos de control específicos, (*checkpoints*) proporcionando el tiempo necesario para que las vías de reparación se activen y restituyan las lesiones. Asimismo, la DDR coordina otros procesos tales como la remodelación de la cromatina, la duplicación y transcripción del ADN y una multitud de procesos celulares, algunos aún no bien conocidos. Si persiste una importante proporción de lesiones, se activan procesos tales como senescencia o apoptosis para evitar la propagación del ADN dañado en las células hijas (Nyberg et al., 2002; Laiho & Latonen, 2003; Niida & Nakanishi, 2006; Bartek et al., 2007; Huen & Chen, 2008; Besson et al., 2008; Jackson & Bartek, 2009; Koguchi et al., 2002; Musgrove et al., 2006; Tchakarska & Sola, 2020; Yue et al., 2020; Shaw & Gullerova, 2021).

En las últimas décadas, muchos estudios han permitido establecer la estructura molecular que sostienen las vías involucradas en la DDR. Si bien hay aspectos no comprendidos en su totalidad, se han identificado varios genes, proteínas y modificaciones postraduccionales que reclutan, fosforilan y activan proteínas y/o complejos proteicos que intervienen en las diferentes vías involucradas. Como se observa en la Figura 1, tras la inducción de daño genético, acuden diferentes proteínas a los sitios dañados que, según su orden de aparición en el esquema

observamos: (a) sensores (amarillo) que detectan y señalan las lesiones en el ADN; (b) mediadores (púrpura) que contribuyen a señalar y/o vincular el ciclo celular con vías de reparación, apoptóticas o senescentes, o colaboran con otras proteínas que promueven actividades específicas; (c) transductores (naranja) que colaboran en el procesamiento y entrega de la información a (d) efectores (azul claro), responsables de desencadenar las respuestas celulares y (e) reguladores (verde), que modulan las funciones de diferentes proteínas.

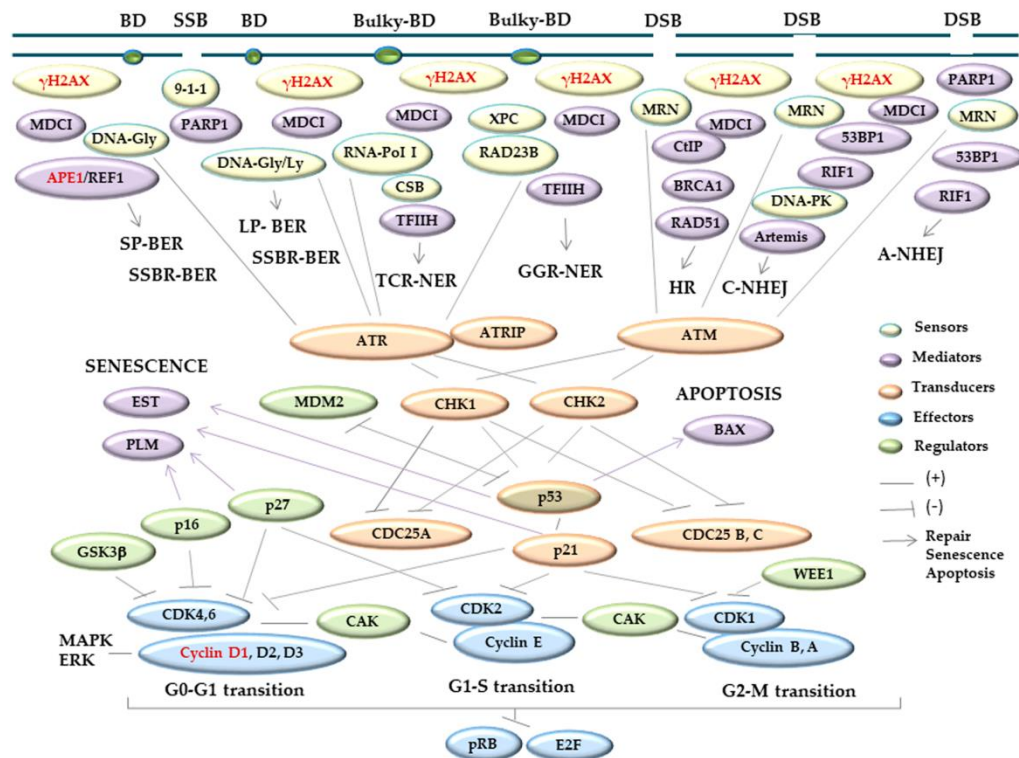


Figura 1.- Esquema de las principales proteínas involucradas en la DDR estándar. El diagrama incluye varias de las principales proteínas que actúan en la detección del daño genético, el control del ciclo celular y su conexión con las vías de reparación del ADN, senescencia y apoptosis en base a los hallazgos de los siguientes autores: Nyberg et al. (2002); Laiho & Latonen (2003); Niida & Nakanishi (2006); Bartek et al. (2007); Huen y Chen (2008); Besson et al. (2008); Jackson & Bartek (2009); Koguchi et al. (2002); Musgrove et al. (2006); Tchakarska & Sola (2020). Abreviaturas: **BD** (daño de base no voluminoso), **Bulky-BD** (daño de base voluminoso), **DSB** (double strand breaks), **SSB** (single strand breaks), **MDC1** (mediator of DNA damage checkpoint protein 1), **MRE11/RAD50/NBS1** (meiotic recombination, double-strand break repair protein/*S. cerevisiae* Rad50 homologue, double-strand break repair protein/Nijmegen breakage syndrome 1, nibrin, respectively), **DNA-PK** (DNA-dependent serine/threonine protein kinase, compuesta por la subunidad catalítica **DNA-PKcs** y las proteínas **Ku70** y **Ku80**), **RAD9/HUS1/RAD1** (RAD9 and HUS1 checkpoint clamp components and RAD1 checkpoint DNA exonuclease, respectively), **ATM** (ataxia telangiectasia mutated), **ATR** (ATM and Rad3-related), **ATRIP** (ATR-interacting protein), **XPC/RAD23B** (xeroderma pigmentosum,

complementation group C/RAD23 homolog B, respectively), **ARN Pol I** (ARN polymerase I) **DNA Gly** (DNA glycosylase with N-glycosylase function), **APE-1** (apurinic/apyrimidinic endonuclease 1), **REF1** (redox-factor 1), **DNA Gly/β-lyase** (DNA glycosylase with N-glycosylase/DNA lyase functions), **RPA** (replication protein A), **RAD17/RFC** (Rad17 checkpoint clamp loader component/DNA replication factor C, respectively), **γH2AX** (H2AX phosphorylation of serine-139) **CHK1,2** (checkpoint protein kinases1,2), **p53** (cellular tumor antigen p53), **p21** (also known as **CDKN1A**, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, belonging to the Cip1 family of the CDK interacting and kinase inhibitory proteins, Cip/Kip) which inhibits **pRB** (retinoblastoma associated protein), **Cyclins/CDK** (cyclins/cyclin-dependent kinase complexes), **pRB/p107/p130/E2F/DP** (pRB/pRB-related proteins p107 and p130/transcription factor E2F/dimerization partner, respectively), **CDK25A,B,C** (cell division cycle-25 A, B, C phosphatases), **MDC1** (mediator of DNA damage checkpoint protein 1), **TopBP1** (topoisomerase II binding protein 1), **53BP1** (p53-binding protein 1) **Artemis** (NHEJ endonuclease), **NHEJ** (non-homologous end joining), **BRCA1, 2** (breast cancer type 1, 2 proteins), **Rad51** (HR recombinase), **HR** (homologous recombination), **MMR** (mismatch repair), **TLP** (trans-lesion polymerases), **PRR** (post-replication repair), **SMC1** (structural maintenance of chromosomes 1, a cohesin protein), **TFIIH** (transcription factor II H), **TCR-NER** (transcription coupled repair of nucleotide-excision repair), **GGR-NER** (global genome repair of transcription coupled repair-nucleotide-excision repair), **SP-BER** (short-patch base-excision repair), **LP-BER** (long-patch base-excision repair), **BAX** (pro-apoptotic Bcl-2 antagonist X protein), **EST** (ever shorter telomeres, a catalytic component of telomerase), **PLM** (promyelocytic leukemia protein), **MDM2** (murine double minute 2, E3 ubiquitin ligase protein), **GSK-3β** (glycogen synthase kinase-3, a proline-directed serine-threonine kinase), **p16** (also identified as **CDKN2A**, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A belonging to Ink4 family of CDK inhibitors), **p27** (also known as **CDKN1B**, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, belonging to the Kip1 family of Kip/Cip CDK inhibitors), **WEE1** (Ser/Thr family of protein kinase 1), **CAK** (CDK-activating kinases). Las proteínas analizadas en este trabajo se presentan con letra color rojo.

Las DSB son señalizadas por MRE11/RAD50/NBS1 (complejo MRN) y DNA-PK, reclutando ATM a los sitios dañados. Las SSB son reconocidas por RAD9/HUS1/RAD1 (complejo 9-1-1), que recluta ATR y forma un heterodímero con ATRIP. Las lesiones de bases que distorsionan la hélice de ADN son detectadas mediante XPC/RAD23B o ARN Pol I, cuando se localizan en los genes activos. En cambio, el daño de bases no voluminoso es reconocido por la glicosidasa bifuncional del ADN (DNA-Glyc/β-liasa) o por la glicosidasa monofuncional (DNA-Glyc) que requiere la interacción de la endonucleasa APE1 y REF1 para generar el SSB intermediario. En ambos casos se recluta a ATR. Durante la replicación, la ADN polimerasa se detiene ante una lesión no reparada mientras que la helicasa continúa desenrollando el ADN delante de la lesión, lo cual genera una SSB. Además, la ausencia de nucleótidos en una SSB no reparada durante la replicación puede producir una SSB en la cadena opuesta de ADN, originando una DSB. Las SSB originadas durante la fase S son recubiertas por RPA y reconocidas por el complejo 9-1-1 y el dímero RAD17/RFC, mientras que las DSB, por el complejo MRN, reclutando a las proteínas transductoras ATR y ATM,

respectivamente. DNA-PK, ATM y ATR fosforilan a la H2AX, formando los foci de γ H2AX, que marcan los sitios de daño del ADN y a su vez, reclutan otras proteínas. Entre ellas se encuentran ATM y ATR, que fosforilan a los transductores CHK1 y CHK2, que a su vez fosforilan y activan a p53, una proteína central de la DDR. P53 promueve la transcripción del inhibidor de CDK p21, que inhibe los complejos efectores Cyclin-D1-3/CDK4, CDK6, Cyclin-E/CDK2 y Cyclin-A, B/CDK1, Cyclin-A/CDK2, contribuyendo a la detención del ciclo celular en los puntos de control G0-G1, G1-S, G2-M e intra-S, respectivamente. Además, CHK1 y CHK2 fosforilan y suprimen la actividad de las fosfatasa CDK25A, B, C. La supresión de CDK25A permite mantener el estado de fosforilación de CDK, inhibiendo a los complejos ciclina-D1-3/CDK4, CDK6, ciclina-A/CDK2 y ciclina-E/CDK2, lo que dificulta la transición del ciclo celular a través de los puntos de control G0-G1, G1-S e intra-S, respectivamente. De manera similar, CDK25B, C inhibe a la ciclina-A, B/CDK1 bloqueando la transición de las células a nivel de la transición G2-M. Además, la inhibición de cualquiera de los complejos ciclina/CDK les impide fosforilar a la proteína efectora pRB. pRB desfosforilada queda asociada al complejo de subunidades múltiples DREAM (pRB/p107/p130/E2F/DP) y no puede promover la transcripción de genes relacionados con la replicación y el crecimiento celular, lo cual impide la progresión del ciclo celular en cada uno de los puntos de control. Algunas proteínas mediadoras de la DDR son MDC1, que interactúa con γ H2AX y recluta ATM y ATR, TopBP1, que colabora con MDC1 en respuesta a DSB y 53BP1, que recluta ATM en los sitios de DSB y también conecta el ciclo celular con el sistema de reparación de asociación de extremos no homólogos (NHEJ), mediante el complejo ADN-PKcs /Artemisa. Otros mediadores de la DDR son: BRCA1, 2 y Rad51 que conectan el ciclo celular con la vía de reparación por recombinación homóloga (HR); RPA y BRCA1, que conectan con los mecanismos de reparación intra-fase S (MMR, TLS o PRR) y SMC1, necesaria para el cese transitorio de la replicación del ADN. Además, TFIIH vincula el ciclo celular con TCR-NER o GGR-NER, y las DNA Glyc y DNA Glyc / β -liasa, con las vías del sistema de reparación por escisión de bases (SP-BER y LP-BER), respectivamente. Cuando se acumula daño no reparado y mediante la transcripción BAX puede desencadenarse la vía apoptótica que actúa a través de p53. También puede ocurrir senescencia celular, mediante la interacción de las proteínas EST y PML con p16, P53 y P21. Muchas de las proteínas son reguladoras, por ejemplo, MDM2 es un regulador negativo de P53- También son reguladores los inhibidores de CDK: p16 de CDK4 y CDK6 y p27 de CDK2 y CDK4 así como las quinasas: GSK-3 β que inhibe a CDK4 y CDK6; WEE1 que Inhibe CDK1 y CAK que son activadores de CDK y deben ser silenciados durante la detención del ciclo celular. La localización subcelular de las ciclinas puede intervenir también en la regulación de las actividades de las ciclinas/CDK. La ciclina D1 se acumula en el núcleo durante la fase G1 y se redistribuye al citoplasma cuando las células entran en la fase S. El secuestro

citoplasmático de la ciclina D1 se asocia con la salida de las células de su ciclo celular (Nyberg et al., 2002; Laiho & Latonen, 2003; Niida & Nakanishi, 2006; Bartek et al., 2007; Huen & Chen, 2008; Besson et al., 2008; Jackson & Bartek, 2009; Koguchi et al., 2002; Musgrove et al., 2006; Tchakarska & Sola, 2020).

Uno de los eventos tempranos de la DDR es la fosforilación de la H2AX, proteína histónica, variante de la H2A, que forma parte del octámero de histonas presente en el nucleosoma (formado por dos moléculas de H2A, H2B, H3 y H4). Este octámero, junto al ADN que lo envuelve representa la unidad estructural básica de la cromatina. La fosforilación ocurre en la serina 139 originando la denominada γ H2AX, responsable de reclutar proteínas que cumplen diferentes funciones en la DDR (Rogakou et al., 1998; Yuan, Adamski & Chen, 2010; Li et al., 2014). La proteína MDC1 induce un bucle que incrementa y mantiene la fosforilación de H2AX. ZNF506, parte del FHA (*fork associated domain*) de MDC1, detecta el daño y activa EYA1/3, que desfosforila el residuo Y142 de γ H2AX, lo cual promueve el reclutamiento de más complejos MRN y ATM y, por tanto, la fosforilación de la siguiente molécula de H2AX en la Serina 139. Este bucle de amplificación de la fosforilación se extiende aproximadamente 30 Mb alrededor de la lesión y da estabilidad a la señal de daño (Cook et al., 2009; Atsumi et al., 2015; Nowsheen et al., 2018).

Atsumi y colaboradores (2015), demostraron que la H2AX se estabiliza rápidamente en respuesta a las DSB para generar eficientemente los foci de γ H2AX. La H2AX sintetizada es normalmente degradada en el proteosoma, a través de su poliubiquitinación mediada por la ligasa E3, HUWE1. Sin embargo, la ubiquitinación se detiene transitoriamente tras la formación de DSB lo que determina su rápida estabilización. La fosforilación de H2AX en la Serina139 mediada por ATM y las proteínas SIRT6 y SNF2H (subunidad catalítica de los complejos de remodelación de cromatina ISWI) son necesarias para bloquear a HUWE1, impidiendo la ubiquitinación de H2AX e induciendo su incorporación a la cromatina sólo cuando las células están dañadas (Figura 2).

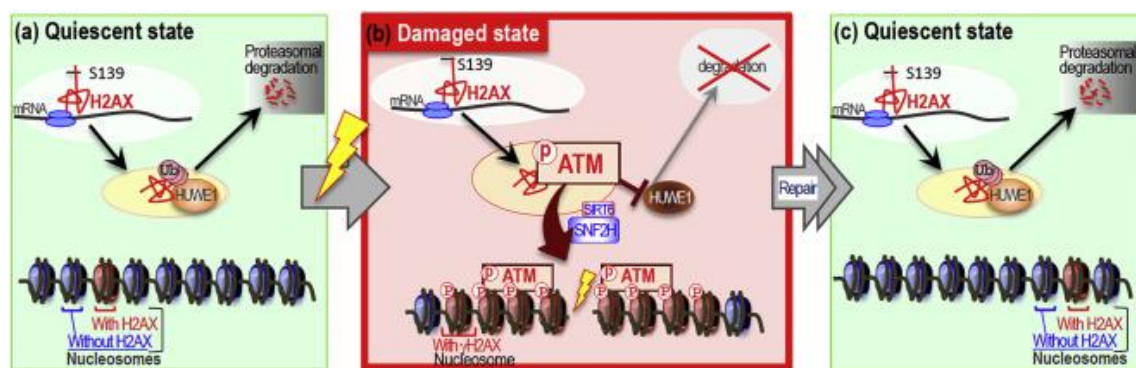


Figura 2.- Esquema de la reparación de DSB mediada por estabilización transitoria de H2AX. **(a)** En el estado quiescente H2AX es regulada negativamente: H2AX se produce continuamente y se degrada a través de la

poliubiquitinación mediada por HUWE1. **(b)** Inmediatamente después de la formación de DSB, H2AX no ubiquitinada se incorpora a la cromatina bajo la regulación de SNF2H, la subunidad catalítica de los complejos remodeladores de la cromatina ISWI y la quinasa ATM, permitiendo la formación de foci de γ H2AX y la reparación de las lesiones. **(c)** Una vez que se reparan las DSB, las células vuelven a su estado de reposo con nueva regulación a la baja de H2AX (Tomado de Atsumi et al., 2015).

Luego de la reparación exitosa, las moléculas de γ H2AX son desfosforiladas por la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y otras como PP4, PP6 y Wip1, o desensambladas de la cromatina y degradadas y los foci de γ H2AX dejan de ser detectables (Yuan, Adamski & Chen, 2010; Siddiqui et al., 2015). H2AX es denominada “guardiana del genoma” ya que es una proteína que se encuentra en la primera línea de la respuesta celular al daño (Rogakou et al., 1999, Burma & Chen, 2001). Además, se emplea como biomarcador en diversas áreas de investigación, diagnóstico temprano de daño inducido, biodosimetría, evaluación de drogas en fase de prueba, evaluación del ambiente y su repercusión en la salud (Kun et al., 2008).

Muchas moléculas se acumulan alrededor de los sitios de lesiones para repararlos según su tipo. Para restituir las DSB, las células activan dos mecanismos principales de reparación: la unión de extremos no homóloga (NHEJ, *Non Homologous End Joining*) y la recombinación homóloga (HR, *Homologous Recombination*). En la NHEJ, los extremos de las DSB son reunidos directamente o luego de un procesamiento limitado por medio de dos vías: (1) la vía clásica (C-NHEJ) que recluta a 53BP1 y depende de POL μ , POL λ y LIG IV y (2) la vía alternativa (A-NHEJ) que recluta a PARP y depende de POL Θ y LIG I y LIG III. La HR requiere el reclutamiento de BRCA1 y BRCA2 y varias proteínas RAD, utilizando a la cadena complementaria como plantilla para la reparación. Esta característica determina que sólo tenga lugar cuando el ADN presenta doble cadena, lo que ocurre durante las fases tardías S y G2. En cambio, la NHEJ puede actuar durante todo el ciclo celular, pero no es tan fiel como la HR y deja errores en el ADN (Sonoda et al, 2006; Li & Heyer, 2008; Jasin & Rothstein, 2013; Davis & Chen, 2013).

Las bases oxidadas o alquiladas (que no distorsionan la doble hélice) y las SSB, son reparadas por el sistema de escisión de bases (BER, *Base Excision Repair*), el cual posee tres vías: (1) la vía LP-BER (*Long patch-BER*) en la que actúa la glicosilasa bifuncional (DNA Glyc β -liasa) con función N-glicosilasa y liasa para escindir el enlace N-glucosídico, creando un sitio AP que es cortado a nivel 3', generando un intermediario monocatenario (ssDNA), rellenado luego por las polimerasas POL δ o POL ϵ ; (2) la vía SP-BER (*Short patch-BER*) que requiere la acción de la glicosilasa monofuncional DNA-Glyc con función N-glicosilasa, que crea un sitio AP pero requiere a la endonucleasa APE1 para escindirlo y generar el intermediario ssDNA más un residuo 5'dRP, que es eliminado por la

POL β , quien también rellena la brecha y (3) la vía SSR-BER (*Single Strand Break Repair*- BER) que repara las SSB luego de ser reconocidas por el complejo 9-1-1, mediante las polimerasas del SP-BER.

Los daños de base que distorsionan la molécula de ADN (uniones-cruzadas, dímeros de pirimidina, 6-4-foto-productos) son reparados por el sistema de escisión de nucleótidos (NER *Nucleotide Excision Repair*) quien cuenta con dos vías: (1) GGR-NER (*Genome Coupled Repair*-NER) que restituye las lesiones en el genoma global y (2) TCR-NER (*Transcriptional Coupled Repair*-NER) que restaura las lesiones generadas en la hebra transcripta. Ambos sistemas poseen diferentes proteínas de reconocimiento (esencialmente XPC y CSA-CSB, respectivamente) pero comparten las demás proteínas intervinientes (varias proteínas XP, POL δ -POL ϵ ; LIG I) (Caldecott et al 2008; Spivak, 2015; Abbotts & Wilson, 2017).

Las células dañadas pueden transferir información célula a célula o por interacción parácrina mediante la liberación de factores soluble tales como, especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (NOS) y factores como TGF- β 1 y TNF- α en el medio extracelular que afecta el microambiente vecino. Se ha descrito un “efecto espectador” que incluye la transferencia de moléculas solubles y su unión a receptores de superficie de células vecinas o alejadas (Malaquin et al., 2015; Havaki et al., 2015).

Cuando las lesiones son irreparables, la señal de daño persiste y las células dañadas activan un programa de muerte celular. La apoptosis clásica es un programa de muerte celular que genera modificaciones bioquímicas y morfológicas, destacándose la fragmentación del ADN y la condensación cromatínica. Los estímulos pro-apoptóticos pueden originarse fuera de la célula, activando caspasas-8/2/10 o dentro de la misma, donde señales pro-apoptóticas (BAX/BAK) o anti-apoptóticas (BCL-2/BCL-XL), convergen a nivel mitocondrial estimulando la liberación de citocromo-c y activando la caspasa-9. Esta vía común, depende de las caspasas-3/6/7 que ingresan al núcleo y activan una ADNasa para el clivado internucleosomal del ADN (Krantic et al., 2005; Galluzzi et al., 2009; Füllgrabe, Hajji & Joseph, 2010). El proceso de apoptosis es acompañado de cambios morfológicos característicos que incluyen la picnosis nuclear, por condensación de la cromatina y la contracción celular. Otro rasgo característico es la generación de ampollas en la membrana plasmática con formación posterior de los denominados cuerpos apoptóticos que contienen restos de citoplasma, organelos y fragmentos nucleares y se eliminan mediante fagocitosis sin inflamación circundante (Battistelli & Falcieri, 2020).

También puede ocurrir que las células detengan su crecimiento, permaneciendo en el estado denominado senescencia, en el cual las señales celulares de respuesta al daño permanecen

activadas. Las células senescentes pueden persistir durante largos períodos, acumulándose en los tejidos y modificando el microambiente que las rodea. Este acontecimiento ocurre a través de la liberación de diversos tipos de moléculas, citoquinas proinflamatorias (IL6, IL8), factores de crecimiento (IGF) y proteínas no solubles en la matriz celular, constituyendo el denominado fenotipo secretor asociado a senescencia (*Senescence Associate Secretor Phenotype*, SASP) Este fenotipo origina el llamado secretoma de senescencia el cual lleva a un estado proinflamatorio con capacidad de alterar el fenotipo y genotipo de las células vecinas (Hari et al., 2019; Chinta et al., 2015).

Daño genético y respuesta celular en el sistema nervioso

Las propiedades fisiológicas de los astrocitos se modifican en función de cambios en el microambiente del SNC que pueden llevar a promover y contribuir en un proceso neurodegenerativo que constituye la base para el desarrollo de varias enfermedades neurodegenerativas (END) como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica. Esto destaca la importancia de los astrocitos en el sustento estructural como funcional en las neuronas y el SN en su conjunto (Zimmer et al., 2024).

Se reconoce en los astrocitos tres modificaciones en el funcionamiento que repercuten con efectos perjudiciales: a) actividad sináptica y homeostasis iónica con desregulación de la actividad del calcio, b) metabolismo energético - lipídico, de captación de glutamato y de la respiración mitocondrial y c) daño genético (Leng K et al., 2021; Sonninen TM et al., 2020; Jiang, Diaz-Castro, Looger & Khakh, 2016; Cassina et al., 2008). Por estos motivos, los astrocitos se consideran clave en el desarrollo de las END, patologías que se caracterizan por presentar función sináptica alterada, pérdida de sinapsis y muerte neuronal (Bae JR & Kim, 2017). Sin embargo, no se conoce en detalle la manera que los astrocitos contribuyen a la progresión de estas patologías o si asumen un rol pivote combinando funciones positivas y negativas.

La acumulación de proteínas con tendencia a formar agregados mal plegados es un rasgo patológico común en muchas END. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica se caracterizan por la acumulación de beta amiloide (A β) y tau fosforilada, huntingtina mutada, α -sinucleína y TDP-43, respectivamente. En condiciones patológicas, estas proteínas sufren cambios conformacionales y forman oligómeros que pueden crear estructuras más grandes (Bayer et al., 2015). La toxicidad relativa de las diferentes proteínas mal plegadas para los astrocitos, sigue siendo objeto de discusión (Hou et al., 2019).

Aunque comparten muchas características comunes, las END son un conjunto diverso de enfermedades impulsadas por factores genéticos y ambientales únicos, que afectan a diferentes regiones del cerebro y se manifiestan con variado repertorio de cambios fisiológicos. Algunas patologías como la EH y la enfermedad de Alexander (AxE) son monogénicas causadas por mutaciones bien definidas en un solo gen (Brenner, Johnson, & Boespflug-Tanguy, 2001; Gusella, Wexler, & Conneally, 1983). Otras como la EA, tienen etiologías complejas en las que la herencia genética se divide entre varios genes y aún no se han dilucidado por completo (Ridge, Mukherjee, & Crane, 2013). La mayoría de los primeros trabajos sobre estas enfermedades se enfocaron en cómo las mutaciones contribuyen en la disfunción neuronal. En algunos casos las mutaciones inician cambios moleculares en los astrocitos que sirven de impulso primario para la aparición de la enfermedad, acompañado con disfunción celular y la pérdida de neuronas. El impacto de las mutaciones genéticas sobre las END puede agruparse en tres categorías: 1) mutaciones en genes con predominio en astrocitos, 2) variantes génicas que se expresan en astrocitos, así como, en otras estirpes celulares, y 3) astrocitos que reaccionan a mutaciones en genes que tienen predominio en neuronas (Zimmer et al., 2024).

En el caso de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), los agregados de TDP-43 pueden afectar directamente la supervivencia de los astrocitos debido a la mala localización subcelular. Hay evidencias que respaldan la existencia de daño en el ADN en varias enfermedades neurodegenerativas, incluida ELA. Se ha sugerido que las mutaciones genéticas presentes en esta enfermedad aumentan la inestabilidad genómica conduciendo al daño en el ADN e incluso, al deterioro de la DDR (Maragakis & Rothstein, 2006; Maly et al., 2021; Kok, 2021).

Los astrocitos se ven afectados de manera diferencial por factores asociados a procesos patológicos, y a su vez influyen en las funciones neuronales y las trayectorias patogénicas de manera selectiva y dependiente del contexto (Hou et al., 2019; Chen & Holtzman, 2022; Zimmer et al., 2024).

Por otra parte, el consumo de alcohol durante el embarazo induce anomalías y deficiencias graves en el feto en desarrollo que se incluyen bajo la denominación de “Trastorno del espectro de alcohol fetal”. Dicho efecto teratogénico, estaría vinculado a alteraciones de la proliferación y diferenciación neural, disminución de la neurogénesis, disrupción del ciclo celular y aumento de la apoptosis de poblaciones celulares (Riar et al., 2016).

¿EtOH y CTS son sustancias con potencial genotóxicas?

El alcohol (EtOH), es esencialmente un depresor del sistema nervioso central (SNC) que causa daño celular con consecuencias estructurales y funcionales (Suman et al., 2016). El sustrato neuro-anatómico en la fisiopatología del alcoholismo radica en las modificaciones de las sinapsis y los circuitos neurales, ejerciendo un efecto negativo sobre la plasticidad sináptica y la formación de espinas dendríticas. Estas alteraciones pueden originar circuitos cerebrales disfuncionales que explicarían los cambios neuro-adaptativos vinculados a la dependencia y al síndrome de abstinencia (Kyzar & Pandey, 2015). La toxicidad del EtOH tanto a nivel del SNC como del SNP (Sistema Nervioso Periférico) es conocida desde hace tiempo, no obstante, los mecanismos subyacentes siguen siendo controversiales (Guerrero et al., 2015). Existen evidencias de que el EtOH puede estar asociado a la genotoxicidad (Kido et al., 2006; Yu et al., 2011). Se considera que el daño neural inducido por EtOH puede ser directo, a través de sus metabolitos, o mediado por la producción ROS, que afecta diferentes moléculas, entre ellas el ADN. Por tanto, es posible suponer que el EtOH puede generar oxidación de bases nitrogenadas, SSB y DSB en el ADN (Merighi et al., 2021). Ya sea por su acción directa, la modulación de sistemas neuroendócrinos o las lesiones en el ADN y otras moléculas, las consecuencias del consumo crónico de EtOH son críticas a largo plazo. Se ha descrito la reducción del volumen cerebral, incremento del tamaño de los ventrículos y alteración de las funciones cognitivas y motoras, trastornos comportamentales y mentales, traumatismos y enfermedades crónicas (Yang et al., 2022; Crews & Nixon, 2009; Mende et al., 2019).

Corticosterona, la hormona del estrés en murinos (CTS)

Las hormonas esteroideas de respuesta al estrés como el cortisol y la corticosterona (CTS) de roedores, son sustancias que actúan en múltiples sectores del organismo y como neuromoduladoras del SNC. Su incremento leve y breve se asocia a una respuesta adaptativa normal (de Kloet, Karst & Joels, 2008; Minois, 2000). Sin embargo, su activación exacerbada o sostenida genera modificaciones en la corteza prefrontal e hipocampo que afectan la cognición-memoria-aprendizaje y predisponen a enfermedades mentales (Duman, Nakagawa & Malberg, 2001; Duman, 2002; Pittenger & Duman, 2007; Watson et al., 2010; Treviño et al., 2021; Bachu et al., 2023). Los estímulos sensoriales desencadenantes se procesan mediante una vía refleja y estereotipada de respuestas neurovegetativas/neuro-humorales donde intervienen tronco encefálico, médula espinal, hipotálamo/hipófisis/suprarrarenales, con liberación de glucocorticoides cortisol (primates) o corticosterona (roedores). Otra vía, adaptativa y plástica, modula la información sensorial y con proyecciones a hipocampo/amígdala/área septal, la dirige

hacia la corteza para planear la respuesta-conductual (Pittenger & Duman, 2007; Watson et al 2010; Treviño et al., 2021; Bachu et al., 2023).

Las hormonas esteroideas, se unen a receptores ubicados en la membrana de las células y a través de sistemas de señalización celular, activan proteínas responsables de la regulación de varios genes. También pueden atravesar las membranas celulares para unirse a receptores nucleares actuando como factores de transcripción de genes específicos (Sarrazin et al., 2009; de Kloet, Karst & Joels, 2008; Smith et al., 1995; Stanisić, Lonard, & O'Malley, 2010; Treviño et al 2021). El consumo incrementado de energía generado por la respuesta al estrés provoca el incremento del metabolismo oxidativo, con acumulación de ROS. El estrés oxidativo se ha vinculado a neurodegeneración (Gonthier et al., 2012; Zakhari, 2006; Mutlu Türkoğlu et al., 2000; Dimitroglou et al., 2003; Singh, Kukreti, Saso & Kukreti, 2019; Weissman & Souza-pinto, 2007) y a inducción de daño en el ADN (Weissman & Souza-pinto 2007; Flint et al., 2007; Srinivas et al., 2019; Gormally et al., 2019).

Dawson y col. (2005), observaron una relación entre el número de situaciones de estrés del pasado y el consumo elevado de alcohol en el presente. En sujetos que consumían altas dosis de alcohol, se observó que, con cada evento estresante adicional, el consumo se incrementaba en un 24% en varones y un 13% en las mujeres. Si bien existen controversias en cuanto a la interdependencia alcohol-estrés (Suman et al., 2016), la asociación de ambos podría potenciar sus efectos sobre el SNC e inducir lesiones en el ADN (Krantic et al., 2005).

Los estudios realizados sobre la DDR en el SNC son limitados. Las vías de señalización serían esencialmente las mismas. Las células neurales también fosforilan la H2AX y la γ H2AX recluta proteínas de la DDR de manera similar a las no neurales (Koguchi et al., 2002; Laiho & Latonen, 2003; Musgrove, 2006; Niida & Nakanishi, 2006; Bartek et al., 2007; Huen & Chen, 2008; Jackson y Bartek, 2009; Chakarska & Solá, 2020). En células neurales también existe un paralelismo entre el γ H2AX señal y el daño inducido al ADN (Kinner et al., 2008; Amente et al., 2019) lo que ha permitido emplear la detección de γ H2AX como marcador de daño genético temprano en el SNC (Barral et al., 2014).

El BER desempeñaría un papel fundamental en la disminución del daño oxidativo espontáneo generado por el metabolismo neuronal alto (el cerebro utiliza el 20% del O₂ que ingresa al organismo) (Chai, Li & Wang, 2015; Narciso et al., 2016). Pueden activarse también NER o NHEJ, según el tipo de lesiones, pero no la HR que requiere hebra homóloga. Si la estabilidad del ADN genómico se ve perturbada, la neurona post-mitótica reentra al ciclo celular para activar la DDR y reparar el daño del ADN, pero evita replicar el ADN. Sin embargo, existen indicios de que la

reentrada al ciclo celular de las neuronas conduce sobre todo a senescencia o muerte por apoptosis, más que a la reparación del daño, lo cual se ha asociado a neurodegeneración (Chai et al., 2015; Narciso et al., 2016; Obulesu & Rao, 2010). El complejo Ciclina D1/CDK, ha sido propuesto como mediador esencial en la muerte neuronal por apoptosis independiente de p53, cuando las neuronas reactivan el ciclo celular luego del daño genético (Nicolai et al., 2015; Barzilai et al., 2016). En células neurales, también se ha descrito el aumento en la expresión del fenotipo SASP, el cual se ha asociado a envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (Chinta et al., 2015).

Daño genético y respuesta de los astrocitos

Los astrocitos son las células gliales más abundante del cerebro. Desempeñan un rol fundamental en la homeostasis del cerebro por su participación activa en el metabolismo neuronal, la plasticidad sináptica y la neuroprotección. Además, son componentes intrínsecos de las respuestas del cerebro a tóxicos e injurias traumáticas, a través de procesos complejos que involucran varias alteraciones moleculares y funcionales que, sin embargo, pueden dar lugar a la interrupción de la homeostasis cerebral y su conectividad (Maragakis & Rothstein, 2006; Sofroniew & Vinters, 2010; Verkhratsky & Nedergaard, 2018; Verkhratsky et al., 2021). Existen varios mecanismos por los cuales los astrocitos protegen a las neuronas del daño, siendo esenciales para el mantenimiento del microambiente que rodea a las neuronas: (a) protección contra la toxicidad de glutamato, (b) protección contra el estrés oxidativo, (c) mediación de mecanismos de reparación mitocondriales, (d) protección contra el estrés metabólico inducido por glucosa, (e) protección contra la toxicidad por hierro, (f) modulación de la respuesta inmune en el cerebro, y (g) mantenimiento de la homeostasis del tejido en presencia de daño en el ADN (Bylicky, Mueller & Day, 2018).

Muchas de las funciones de los astrocitos involucran la comunicación célula-célula con neuronas u otras células gliales, la cual se lleva a cabo mediante la liberación de factores solubles al medio extracelular o la liberación regulada de vesículas extracelulares (Durkee & Araque 2019; Varjan et al. 2019), así como mediante nanotubos y microtubos (Osswald et al., 2015; Chen y Cao, 2021). Las vesículas extracelulares (EVs: *extracellular vesicles*) liberadas por los astrocitos incluyen exosomas (el diámetro es de alrededor de 50 a 100 nm) y ectosomas o microvesículas que podrían alcanzar > 1000 nm de diámetro (Cocucci y Meldolesi, 2015). Además, tras una estimulación repetitiva con ATP, los astrocitos cultivados pueden liberar vesículas grandes, de 1 a 8 µm de diámetro (Falchi et al., 2013). Las EVs pueden contener moléculas involucradas en la protección neuronal como las proteínas de membrana, lípidos, moléculas de señalización, ARNm, microARN,

ARN largos no codificantes, ADNmt, factores de crecimiento, citoquinas (Wang et al., 2011; Taylor et al., 2007; Khattar et al., 2019), o moléculas dañinas como la superóxido dismutasa I mutada que induce la muerte de las neuronas receptoras (Basso et al., 2013; Jiménez-Riani et al., 2017).

Los nanotubos (NTs) de astrocitos varían de 50 a 200 nm, pero pueden alcanzar aproximadamente 700 nm de largo (Chen y Cao, 2021) y permiten la comunicación entre células neurales que cubren distancias de alrededor de 500 μ m (Valdebenito et al., 2019; Khattar et al., 2022). Los NTs son inducidos por hipoxia, estrés oxidativo (Valdebenito et al., 2021), activación de p53 o microambiente ácido (Khattar et al., 2019). Los microtubos son más gruesos (más de 0.7 μ m de ancho), comparten muchas características con los nanotubos y se describieron en gliomas (Khattar et al. 2019). Tanto los NTs como los microtubos parecen desempeñar papeles importantes en muchos procesos celulares fisiológicos y patológicos, mediante el establecimiento de "conductos abiertos" que transportan iones, orgánulos (vesículas, lisosomas, mitocondrias) o moléculas (microARN, ácidos nucleicos, aminoácidos o proteínas, compuestos dañinos), ayudando a sincronizar a las células, o a inducir diferenciación celular o propagar alteraciones neurodegenerativas (Osswald et al., 2015; Chen & Cao, 2021; Khattar et al., 2021).

Los astrocitos establecen también comunicación con células endoteliales microvasculares, donde intervienen junto a los pericitos en la formación de la barrera hematoencefálica (BHE) (Sofroniew & Vinters, 2010). De este modo, pueden modular el flujo sanguíneo local en respuesta a la actividad neuronal, liberando sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico o el ácido araquidónico. Son capaces de transportar oxígeno, glucosa y otros sustratos desde la sangre a las neuronas (Lovick, Brown & Key, 2005; Sofroniew & Vinters, 2010; Escartín et al., 2021). La BHE regula estrictamente lo que ingresa desde la circulación sanguínea al parénquima cerebral, manteniendo su baja permeabilidad mediante uniones estrechas entre las células endoteliales (Liu, Liu, Bao, Bai & Wang, 2020). Los procesos citoplasmáticos de los astrocitos (pies terminales) envuelven las células endoteliales de los vasos sanguíneos, formando una membrana limitante glial (Sofroniew & Vinters, 2010; Tabata, 2015). Estos procesos de permeabilidad limitada están mediados por transportadores de iones, proteínas de unión y la acuaporina-4 (AQP4), un canal de agua específico de los astrocitos (Sofroniew & Vinters, 2010; Zador, Stiver, Wang & Manley, 2009). Un rol importante de la BHE es la restricción al pasaje de células inmunes periféricas (Rua & McGavern, 2018) y el mantenimiento de la integridad del sistema cerebroespinal (Brøchner, Holst & Møllgård, 2015; Whish et al., 2015). Cuando se compromete la integridad de la BHE pueden infiltrarse moléculas nocivas y células inmunes que liberan citocinas proinflamatorias y ROS que conducen a neuroinflamación y posible neurodegeneración (Rua & McGavern, 2018).

Como los astrocitos son células proliferativas, poseen la capacidad de activar la DDR de manera similar a las células no neuronales (Nyberg et al., 2002; Laiho & Latonen, 2003; Niida y Nakanishi, 2006; Bartek et al., 2007; Huen & Chen, 2008; Jackson & Bartek, 2009) (Figura 1). Una de las proteínas efectoras de la DDR, la Ciclina D1 se expresa en astrocitos (Ciapa & Granon, 2018). Los complejos Ciclina D1/CDK 4,6 promueven la progresión del ciclo celular, pero cuando estos complejos se inhiben permiten la detención del ciclo celular en el punto de control (*checkpoint*) de la transición G0-G1 (Koguchi et al., 2002; Musgrove et al., 2006; Tchakarska & Sola, 2020). (Figura 1). En astrocitos también se fosforila la serina-139 de la variante H2A y se ponen en juego proteínas mediadoras, que al igual que en células no neurales vinculan el ciclo celular con las vías de reparación del ADN (Sancar et al. 2004; Yan et al., 2014, Mjelle et al. 2015), apoptosis (Roos y Kaina, 2006; Larsen & Sørensen, 2017) o senescencia (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Kuilman et al., 2010), dependiendo de la naturaleza y el alcance del daño del ADN (Figura 1). El mal funcionamiento de la DDR se haya asociado a la etiología de los trastornos de inestabilidad del genoma cerebral (Barzilai, 2013; Shacham et al., 2016).

Además, dado lo relevante del trabajo en conjunto que realizan astrocitos y neuronas y su rol crucial en el proceso de aprendizaje y memoria a largo plazo, la expresión de Ciclina D1 fue postulada como un posible monitor molecular de actividad cerebral (Pittaras et al., 2016).

Existe evidencia que los astrocitos terminalmente diferenciados son deficientes en la señalización DDR, pero son competentes en la reparación del ADN (Schneider et al., 2012). En cambio, los astrocitos que proliferan normalmente son competentes en ambos (Wang et al., 2011; Bylicky et al., 2019). Los astrocitos utilizan la vía BER para restituir el daño oxidativo del ADN. En este sentido, el estrés oxidativo, estimula la expresión de la endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 (APE1), una proteína central del BER que forma un complejo con REF1 y actúa tras las glucosilasas para eliminar las bases dañadas (Waters et al., 1999; Hill et al., 2001). Es una proteína multifuncional relacionada también con la regulación de la expresión génica, las respuestas antioxidantes y antiinflamatorias y el mantenimiento de los genomas nucleares y mitocondriales (Barchiesi et al., 2021). Su extremo N-terminal desordenado es esencial para su reclutamiento nuclear y la interacción con otros factores del BER (Park, et al., 2013; Baek et al., 2019; Tosolini et al., 2020). Sin embargo, los astrocitos poseen una competencia reducida del NER, especialmente la relacionada con la vía GGR-NER (Yamamoto et al., 2019) pero pueden utilizar la HR y NHEJ para la reparación de DSB (Li & Heyer, 2008; Jasin & Rothstein, 2013; Davis & Chen, 2013).

Activación astrocitaria

En respuesta a injurias como trauma, infección, acumulación de proteínas mal plegadas y excitotoxicidad (Yang, Liu & Zhang, 2024; Escartin et al., 2019 & 2021), los astrocitos son capaces de adoptar un fenotipo reactivo. A diferencia del estado típicamente inactivo de los astrocitos maduros, los reactivos pueden volverse hipertróficos y proliferativos y esta reacción, denominada astrogliosis, es la base para la formación de cicatrices gliales (Anderson et al., 2016; Gallo & Deneen, 2014; Liddelow & Barres 2017). Los análisis genéticos de astrocitos bajo una variedad de estímulos han demostrado que presentan distintos patrones de expresión genética (Zamanian et al., 2012), sugiriendo, una respuesta reactiva diversa o heterogénea (Liddelow & Barres (2017; Lawrence et al., 2023). Los cambios dinámicos en la expresión génica, afectan a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un filamento intermedio del citoesqueleto, a la vimentina, nestina, (Smit et al., 2021; Escartin et al., 2019; Sun & Jakobs, 2012), la proteína β fijadora de calcio S100 (S100 β), la glutamina sintetasa (GS) y el transportador de glutamato/aspartato (GLAST), así como la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α), ROS y NOS (Sun & Jakobs, 2012; Boulay et al., 2017; Liddelow & Barres, 2017).

Los patrones de expresión molecular y funcional han permitido describir dos fenotipos funcionales, distintos denominados A1 y A2, (Liddelow et al., 2017; Escartí et al., 2021). El tipo A1, neuroinflamatorio, neurotóxico o proinflamatorio, se relaciona a la patología generada por el fenotipo reactivo y el tipo A2, neuroprotector o proliferativo se asocia a la reparación asociada al fenotipo reactivo. De todos modos, la nomenclatura A1/A2 no es universalmente aceptada, ya que dicha dicotomía no logra representar la diversidad (Escartin et al., 2021).

La inducción de los astrocitos inactivos hacia el fenotipo reactivo, proinflamatorio está mediada por la microglía y los macrófagos residentes en el SNC. La microglía y los astrocitos interactúan frecuentemente como soporte del SNC. En la unidad neurovascular, la microglía se encuentra junto a astrocitos y células endoteliales, permitiéndoles detectar injurias que ingresan desde la periferia (Liu et al., 2020). En las regiones dañadas, la microglía interviene junto a los astrocitos en la formación de la cicatriz glial (astrogliosis). Las proyecciones rodean y perforan el soma neuronal permitiendo que la microglía fagocite a las células dañadas. La estrecha asociación astrocito-microglía también permite una eficiente señalización paracrina desde la microglía hacia los astrocitos (Lana et al., 2021). Es de destacar que la astrogliosis reactiva es una característica patológica de la ELA (Schiffer et al., 1996; Stoklund & Van Den Bosch, 2023) lo que indica un papel de los astrocitos en la patogénesis de esta enfermedad.

Se ha observado apoptosis en astrocitos reactivos de cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer y encefalitis por VIH y también en cultivos de astrocitos después de inducir su reactivación con lipopolisacárido (LPS) u otros estímulos inflamatorios. Si bien se desconocen los mecanismos subyacentes, esta apoptosis podría presentar un mecanismo autorregulado para controlar la gravedad de la inflamación en el cerebro (Sun et al., 2016).

En astrocitos pueden funcionar tanto la vía extrínseca como la intrínseca de la apoptosis. La vía apoptótica extrínseca es la depende del receptor de muerte de la superficie celular, el cual responde a la superfamilia de factores de necrosis tumoral (TNF) y ligandos de muerte específicos (Ashkenazi, 2002). La vía intrínseca se desencadena por diversos tipos de estrés celular como la hipoxia, el estrés oxidativo y el daño del ADN, formando parte de la DDR. BAX es una proteína pro-apoptótica de la familia BCL-2 que actúa en la vía intrínseca (Klanova & Klener, 2020), converge en la mitocondria determinando la liberación de citocromo-c y el clivaje de Caspasa-9 (Elmore, 2007; Borges, Linden & Wang, 2008; Yan, Sorrell & Berman, 2014; Klanova & Klener, 2020).

Los astrocitos comprenden una población heterogénea de células, variantes morfológicas que pueden coexistir en una determinada región cerebral. Los astrocitos protoplásmicos están organizados en dominios espaciales que no se superponen, mientras que los astrocitos fibrosos no cumplen con este patrón (Sun & Jakobs, 2012). También hay diferencias funcionales según la citoarquitectura de la región del cerebro y la etapa de desarrollo cerebral (Bushong et al., 2002; Bayraktar et al., 2020). A nivel morfológico los astrocitos poseen procesos delgados similares a los lamelipodios que se remodelan mediante su extensión y retracción, siendo más móviles que su contraparte dendrítica (Hirrlinger et al., 2004; Haber et al., 2006; Reichenbach & Wolburg, 2005). El citoplasma está atravesado por fibras y filamentos que se extienden formando haces paralelos dentro de los procesos. Son similares a los neurofilamentos, aunque sus dimensiones son menores y suelen presentarse en haces compactos (Peter, 1991).

S100 β es una proteína de unión a Ca²⁺ que se expresa abundantemente en astrocitos y aumenta en la astrogliosis y los trastornos degenerativos e inflamatorios. Se encuentra de manera difusa en el citoplasma y se asocia con membranas y citoesqueleto de actina F, por lo cual, podría tener un papel en el mantenimiento de la forma estrellada de los astrocitos diferenciados. Ha sido relacionada con la regulación del ensamblaje de microtúbulos y filamentos intermedios de tipo III, la proliferación, diferenciación (Ibrahim et al., 2013) y migración de astrocitos reactivos, en virtud de su capacidad para regular las vías Src/PI3K/RhoA/ROCK y Src/ PI3K/Akt/GSK3 β / Rac1.

Los astrocitos poseen prominentes fibras de actina (en su forma poligonal), que depende de un alto estado de activación de la miosina II (John, 2004). Por el contrario, cuando los astrocitos cambian a una forma estrellada *in vitro*, la presencia de fibras de actina se reduce y organiza en redes de actina dependientes de Arp2/3 (Zhang & Vavylonis, 2023).

La morfología de los astrocitos se organiza en base a una red compleja compuesta de finas proyecciones arborescentes enriquecidas en microfilamentos de actina y proteínas relacionadas con la actina como ezrin y Arp2/3 (Haseleu et al., 2013). Los delgados procesos astrocíticos (PA) se compone principalmente de microtúbulos, filamentos intermedios de GFAP (Jurga et al., 2021) y microfilamentos de actina (Haseleu et al., 2013). Los PA GFAP positivos en una suspensión de células gliales morfológicamente intactas también contienen microtúbulos y microfilamentos de actina. Los PA son particularmente ricos en microfilamentos, lo que también se observa en los filopodios de astrocitos cultivados (Lavialle et al., 2011).

El núcleo astrocitario presenta una densidad uniforme, con algunos cromocentros. En la mayoría de los astrocitos en reposo, no se observan nucléolos (Brat, 2010) aunque en ocasiones se visualiza sólo uno (Peter, 1991; Peters, 2004). El nucléolo es una estructura nuclear dinámica constituida por ADNr y proteínas ribosomales. Su principal función es la síntesis, transcripción de ARN ribosomal y ensamblaje de las subunidades ribosomales, de modo que el tamaño del nucléolo, así como su número es un indicativo de la actividad celular (Allen et al., 2014). La tinción con DAPI muestra al nucléolo como una estructura nuclear débilmente coloreada, rodeada por una región DAPI intensa y positiva para la H3K27m3 (trimetilación de la lisina en posición 27 de la histona H3), la cual es una marca epigenética característica de la heterocromatina. Esta región también es positiva a los anticuerpos anti-ribonucleoproteína.

Fundamentación del problema de investigación

Entre los compuestos exógenos que desafían la integridad del ADN están el EtOH (Mutlu Türkoğlu et al., 2000; Kido y otros, 2001; Russo et al., 2001; Zakhari, 2006) y entre los factores endógenos que responden a causas exógenas, tenemos las hormonas del estrés como el cortisol y la CTS murina (Madrigal et al., 2001; Flint et al., 2007; Chainy y Sahoo, 2020). El EtOH una sustancia de uso extendido en la población mundial (WHO, 2022; 2015; MS, 2022). Aproximadamente 1.5 % de la población mundial presenta un trastorno por su consumo (WHO, 2022). Esta molécula pequeña, altamente soluble, puede atravesar las membranas celulares, incluida la BHE e interactuar a través del hidrógeno o mediante interacciones hidrofóbicas débiles con múltiples biomoléculas (Abrahao et al., 2017). Una vez absorbida en el cuerpo, el EtOH se

metaboliza rápidamente y tanto sus metabolitos como los ROS pueden dañar el ADN (Mutlu Türkoğlu et al., 2000; Zakhari, 2006; Gonthier et al., 2012). El estrés parece contribuir al aumento del consumo de EtOH (Alhaddad et al., 2020) y la liberación de los mediadores del estrés (Kadmiel & Cidlowski, 2013), puede asociarse a los trastornos por consumo de alcohol (Alhaddad et al., 2020). Incluso, una dosis aguda de EtOH puede activar al eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal, aumentando la liberación de CTS (Rivier et al., 1984), sugiriendo una especie de bucle de refuerzo. Existen evidencias de que la acción conjunta de EtOH y CTS podría provocar daño oxidativo, SSB y DSB en células neurales tanto en casos de exposición crónica como aguda y de corta duración (Flint et al., 2007; Flaherty et al., 2017; Madrigal et al., 2001; Chainy & Sahoo, 2020), afectando la supervivencia neuronal (Shadfar et al., 2022). Los efectos combinados del EtOH y la CTS a nivel celular mediante la respuesta al daño (DDR) han sido menos estudiados. Además, se ha propuesto que el daño del ADN de los astrocitos puede contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Kok et al., 2021). Los aspectos mencionados y dado que los astrocitos desempeñan un rol fundamental en la homeostasis del cerebro y su alteración está asociada a enfermedades del SNC, consideramos de interés analizar la inducción de daño agudo por EtOH y/CTS y su respuesta ante este tipo de injuria en un modelo murino *in vitro*.

Problema de investigación

Nos proponemos conocer si la exposición aguda tanto a EtOH como a concentraciones moderadas del mediador de estrés CTS, actuando conjunta o individualmente, son capaces de generar daño en el ADN de astrocitos hipocampales murinos, induciendo una respuesta temprana y similar a la DDR descrita para células no-neurales y, eventualmente, modificaciones del repertorio comunicacional y signos de muerte o reactividad.

Hipótesis

La exposición aguda a las concentraciones de trabajo de EtOH y CTS seleccionadas, ya sea mediante exposición individual o combinada, induce daño en el ADN astrocitario y activación temprana de la DDR.

Objetivo general

Analizar la inducción temprana de la DDR de astrocitos hipocampales, ante un episodio de exposición aguda a EtOH y/o CTS, así como su influencia en el repertorio de NTs y VEs, en signos de muerte celular o reactividad.

Objetivos específicos

1. Determinar las mínimas concentraciones de trabajo de EtOH y/o CTS que generen daño en ADN cuantificable
2. Detectar y analizar el daño inducido en el ADN (esencialmente DSB: expresión de γ H2AX)
3. Analizar el rápido desencadenamiento de la DDR (expresión temprana de γ H2AX, Ciclina D1, APE 1 y BAX)
4. Detectar signos de astrogliosis (microscópicos y expresión de faloidina, GFAP, S100 β y nucléolos)
5. Examinar modificaciones de la superficie astrocitaria en términos de NTs y VEs adheridas a la membrana

MATERIALES y MÉTODOS

Cultivos primarios de astrocitos hipocampales

Se trabajó con 21 ratas neonatas machos con menos de 1 día post-parto (1DPP) de la cepa Wistar proveniente del bioterio de Facultad de Ciencias, para realizar 7 cultivos independientes. En todos los casos se cumplió con el protocolo aprobado por la Comisión Ética para el Uso de Animales de Experimentación del IIBCE (CEUA-IIBCE) y CHEA (número de protocolo asignado: 005/08/2016).

El cultivo se realizó de acuerdo a Olivera-Bravo y cols. (2011) con modificaciones menores. Las ratas fueron decapitadas bajo campana de flujo laminar, se disecó el cerebro, se colocó en buffer PBS 10 mM, pH 7.4, estéril y se retiraron las meninges. El cerebro limpio se pasó a otra placa con PBS estéril donde se disecó el hipocampo y se procedió con la disgregación química y mecánica del tejido hasta obtener un homogeneizado, utilizando buffer Tripsina-EDTA al 5% con incubación de 25 min a 37 °C, y agitación suave.

El homogeneizado celular de hipocampo se pasó por tamiz estéril de 80 µm, se centrifugó a 400g y se sembró en medio DMEM (medio de *Eagle* modificado, Gibco, 12800082) con suero fetal bovino (SFB, Gibco, 12657011) **10 %** en botellas de cultivo con tapa de filtro (*cell culture flask*, T25, Eppendorf) a una densidad de 400000 cel/mL. Las células fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO₂ en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB y antibióticos penicilina/estreptomicina (Gibco, 15140122). Se realizó el cambio de medio por medio fresco 3 veces por semana durante 3 semanas. Una vez que se alcanzó el 90% de confluencia, se replicó el cultivo para expandir el número de células y proceder al enriquecimiento en astrocitos.

Una vez logrado un crecimiento exponencial del cultivo (15 días, aproximadamente), se procedió con el conteo celular y re-siembra de células sobre diferentes sustratos dependiendo del ensayo a realizar: portaobjetos con pocillo de reacción de teflón tamaño estándar 8x6 mm diámetro con fondo negro (*Tef-Tek Micro Slides premium*, PORLAB) o cubreobjetos de vidrio de 12 - 4 mm de diámetro (Citoglas[®]) para análisis mediante microscopía de fluorescencia o en membrana autoclavable para cultivo en plano de células adherentes (*Aclar, Electron Microscopy Sciences*) y posterior análisis mediante microscopía electrónica de barrido. Veinticuatro horas antes de cada experimento, se disminuyó el porcentaje de SBF al 2% para favorecer la quiescencia del cultivo.

Tratamiento de los cultivos

Todos los tratamientos se realizaron directamente sobre las células sembradas en los diferentes sustratos. Los mismos fueron llevados a cabo por triplicado o cuadruplicado según el ensayo. La incubación de las drogas y sus respectivos controles se efectuó a 37° C en estufa gaseada con CO₂ al 5% (Figura 1).

Determinación de las concentraciones de trabajo

Para seleccionar la concentración de trabajo de EtOH y CTS, se realizaron curvas de dosis-respuesta agregando 0 - 800 mmol/L de EtOH o 0 - 2 µmol/L de CTS en cultivos de astrocitos confluentes durante 1 h. La morfología, el número y la supervivencia de los astrocitos se evaluaron en DIC e imágenes confocales de inmunotinción con GFAP y etiquetado con faloidina (Jiménez-Riani et al., 2017). El daño al ADN se evaluó mediante inmunofluorescencia γH2AX.

Según el análisis de la curva de dosis, las condiciones experimentales fijadas fueron las siguientes: controles (medio de cultivo (CM) y 0.03 % (DMSO), EtOH 400 mmol/L, CTS 1 µmol/L y EtOH+CTS 400 mmol/L y 1 µmol/L, respectivamente. Para establecer los experimentos, inicialmente se utilizó bleomicina (2.5 µg/L) como control positivo de daños en el ADN (Liddle et al., 2014). Todos los tratamientos duraron 1 h y las células se fijaron inmediatamente para evaluar todos los marcadores analizados. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron en PBS 10 mM, pH 7.4 y se fijaron inmediatamente con paraformaldehído al 4% (PAF, 15 min) durante 15 min. Después de 3 lavados con PBS (10 minutos cada uno), las células se sometieron a un marcaje de inmunofluorescencia indirecta.

Diseño experimental

Para llevar a cabo los objetivos propuestos, cultivos primarios de astrocitos fueron expuestos durante 1 h a EtOH, CTS y EtOH+CTS (a las concentraciones indicadas en la Tabla 1). Se emplearon como controles: medio de cultivo (CM, como control del EtOH) y DMSO (diluyente de CTS como su control). Luego, cada uno de los cultivos correspondientes a los grupos experimentales (CM, DMSO, EtOH, CTS y EtOH+CTS) fueron marcados con anticuerpos anti-γH2AX (daño genético), anti-Ciclina D1 (proteína del control del ciclo celular), anti-APE1 (endonucleasa del BER); anti-BAX (proteína pro-apoptótica de vía intrínseca), anti-H3K4me3 (marca de eucromatina), anti-H3K9me3, (marca de heterocromatina); anti-RNP (ribonúcleo-proteína del nucléolo), anti-GFAP (proteína fibrilar ácida), anti-S100β (proteína de unión a Ca²⁺), y con Alexa

633-Faloidina, (proteína del citoesqueleto de actina F). Los datos obtenidos luego del análisis de las imágenes correspondientes a cada una de las variables mencionadas en cada grupo experimental, fueron comparados mediante herramientas estadísticas a fin de establecer diferencias entre los grupos según lo propuesto en los objetivos.

Tabla 1.- Diseño experimental empleado

Tratamientos (1h)	MC	DMSO	EtOH	CTS	EtOH+CTS
Concentraciones	-	0.03%	400 mmol/L	1 µmol/L	400 mol/L+1 µmol/L
Marcadores					
γH2AX	H2AX fosforilada en Ser 139, biomarcador de daño genético (foci de γH2AX)				
Ciclina D1	Proteína de la vía de control ciclo celular				
APE1	Endonucleasa de la vía de reparación por escisión de nucleótidos (BER)				
BAX	Proteína involucrada en la vía intrínseca de la apoptosis				
GFAP	Proteína fibrilar acida del citoesqueleto				
S100β	Proteína de unión al calcio				
Faloidina	Proteína del citoesqueleto de actina F				
H3K4me3	Marca epigenética de euromatina (cromatina laxa)				
H3K27me3	Marca epigenética de heterocormatina (cromatina compactada)				
RNP	Ribonúcleo-proteína específica del nucléolo				

Ensayos de inmunocitofluorescencia indirecta

Las células fijadas con PAF 4% durante 15 min se lavaron con PBS, 3 veces durante 3 minutos cada una, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5 % (20 min) y luego se bloqueó la unión no específica con albúmina sérica bovina (BSA) al 2 % durante 30 min. A continuación, se realizó la incubación con anticuerpos primarios (Tabla 2) diluidos en BSA al 2% a 37°C durante 30 min en cámara húmeda. Posteriormente se realizaron 3 lavados (5 min cada uno) con PBS y la incubación con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos que emiten a 488, 546 o 633 nm durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda y oscura. En el conjunto de experimentos de dosis-respuesta, se agregaron diluciones 1:250 de Alexa Fluor™ 633 faloidina (A22284, Invitrogen), junto con los anticuerpos secundarios. Después de 3 lavados (de 5 minutos cada uno), las células se incubaron con 1.5 µg/ml de 4.6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, ab2629482, Abcam) que se utilizó como contratinción nuclear. Luego, las células se montaron en Prolong Gold antifade (P36930, Invitrogen) y se sellaron con esmalte de uñas incoloro (Liddle et al., 2014; Reyes-Ábalos et al., 2018). Las preparaciones se conservaron protegidas de la luz y se conservaron a 4°C hasta la obtención de imágenes por microscopía confocal.

Tabla 2.- Anticuerpos primarios y secundarios y sus correspondientes diluciones.

Anticuerpos primarios (nombre, fabricante, código)	Dilución
Mouse Anti-gamma H2AX (phospho S139) antibody [9F3], abcam, ab26350	1/300
Rabbit Anti-Cyclin D1 antibody, abcam, ab16663	1/200
Mouse Anti-APE1 antibody, abcam, ab194	1/500
Rabbit Anti-GFAP antibody, abcam, ab4674	1/500
Rabbit Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein antibody, Sigma-Aldrich, G9269	1/400
Mouse Anti-S-100 (β -Subunit) Protein antibody, Sigma-Aldrich, S2532	1/500
Rabbit Anti-Histone H3 (tri methyl K4) antibody - ChIP Grade, abcam, ab8580	1/400
Mouse Anti-Histone H3 (tri-methyl K27) antibody [mAbcam 6002] - ChIP Grade, abcam, ab6002	1/200
Rabbit Anti-RNP antibody, Kun et al. (2007)	1/500
anti-BAX, abcam, ab7977	1/200
Anticuerpos secundarios (nombre, fabricante, código)	Dilución
Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor™ 546, Invitrogen, A-11030	1/300
Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor™ 488, Invitrogen, A-11008	1/500
Goat anti-chicken IgY (H+L) Alexa Fluor™ 488, Invitrogen, A-11039	1/500
Goat anti-chicken IgG (H+L) Alexa Fluor™ 633, Invitrogen, A-21103	1/300
Goat anti-chicken IgY (H+L) Alexa Fluor™ 488, Invitrogen, A-11039	1/500

Adquisición de imágenes mediante Microscopía Láser Confocal

Se tomaron imágenes de astrocitos de los diferentes grupos experimentales hasta completar un mínimo de 100 - 250 células por grupo experimental con un microscopio confocal invertido Zeiss LSM - 800 (con tres detectores GaAsP, un detector T-PMT y 4 líneas de láseres 405, 488, 561, 640 nm), empleando una lente de inmersión en aceite *Plan Apochromatic* (63x, 1.4 NA) con y sin zoom (2.5), en modo de escaneo secuencial y utilizando tres líneas de LÁSER 405, 488, 546 nm. Se obtuvieron también imágenes de alta resolución con el módulo de super-resolución

Zeiss. Las imágenes se guardaron con una resolución de 2048 x 2048 píxeles en archivos digitales con formato no comprimido de extensión CZI.TIFF (.TIFF).

Considerando que los tamaños nucleares varían dependiendo del grupo experimental, se estableció como criterio de trabajo tomar entre 10 y 12 campos por preparado para contar con un mínimo de 100 células por grupo experimental. Se adquirieron las imágenes empleando el mismo protocolo descrito en secciones anteriores.

También se tomaron imágenes con un microscopio directo láser Olympus FV-300, utilizando una lente objetivo de 60x con y sin zoom (1x, 2.5x), en modo de escaneo secuencial en orden creciente de longitud de onda de los diferentes láser (405, 488, 546 nm). La resolución por imagen fue de 1024 x 1024 píxeles y las mismas se guardaron en formato no comprimido .TIFF.

Preparación de muestras y adquisición de imágenes mediante Microscopía Electrónica de Barrido

El procedimiento aplicado fue adaptado de Heckman et al. (2004). Los astrocitos cultivados en película Aclar como en Jiménez-Riani et al. (2017) y Reyes-Ábalos et al. (2024). Se fijaron en glutaraldehído tibio al 2.5% en tampón fosfato (PB) 100 mM, pH 7.3 durante 18 h, luego se retiraron de la solución fijadora y se lavaron en PBS 3 veces durante 5 min cada una. Luego se realizó un tratamiento post-fijación de 30 minutos con tetróxido de osmio para estabilizar las membranas celulares. Después de 5 lavados de 10 min cada una, se realizó una deshidratación química basada en concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 80%, 90% y 100%). Posteriormente, los astrocitos fueron sometidos a un proceso de eliminación de solventes, utilizando un equipo de secado de punto crítico de CO₂ para mantener intacta la estructura interna celular. Finalmente se realizó la metalización de las muestras con oro puro mediante una técnica de sputtering (plasma de oro) y, finalmente se montaron en tacos individuales de bronce para ser observados en el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 5900 LV (Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido, Facultad de Ciencias, Universidad del República). Las imágenes de la superficie astrocítica de cada condición experimental se obtuvieron utilizando electrones secundarios a 20 mA con 1.000x, 2.000x, 3.000x, 10.000x y 30.000x, para lo cual fueron procesadas siguiendo un procedimiento estándar para este tipo de microscopía y se guardaron en formato no comprimido (.TIFF) (Heckman et al., 2004).

Procesamiento de imágenes

Las imágenes digitales obtenidas aplicando ambos tipos de microscopía fueron analizadas empleando FIJI, según el objetivo de análisis:

1) Para analizar la marca nuclear, se diseñó un código digital de comando para trabajar en formato *batch*. Esta herramienta nos permitió ejecutar bloques de acciones en forma automática y ágil, trabajando por carpeta de imágenes y optimizando los tiempos de procesamiento de imágenes al igual que los de análisis. El código que ejecuta parte del análisis contiene los comandos para las siguientes acciones: **a)** apertura de los archivos de imágenes .TIFF, **b)** separación en los diferentes canales de fluorescencia, por ejemplo: canal verde (AlexaFluor 488) = marcación de GFAP, canal rojo (AlexaFluor 543) = marcación de foci de γ H2AX y canal azul (DAPI 405) = contratinción nuclear, **c)** conversión a 8 bits con una profundidad de píxeles de 0-255, **d)** segmentación y generación de máscaras binarias para cada uno de los canales, **e)** definición de regiones de interés (*ROIs*) en cada canal y almacenamiento de sus coordenadas en un archivo zip.*ROIs*, **f)** apertura de las coordenadas de las *ROIs* en las imágenes originales por canal de fluorescencia, por ejemplo: γ H2AX en canal rojo, de GFAP en canal verde, DAPI en canal azul, **g)** medición de valores de áreas, intensidades medias de fluorescencia por canal y descriptores matemáticos de formas para los núcleos astrocitarios.

Una vez obtenidos los datos se creó una planilla por experimento, que se reorganizó de forma manual para crear una matriz unificada, asociando cada núcleo astrocitario con la cantidad de foci y las variables descriptivas, organizadas por grupo experimental.

2) Para analizar la marca nuclear y citoplasmática, se diseñó un nuevo código de programación específico para correr en *batch*. El código para este análisis fue llamado "*batch_nucleo_no_nucleo*" el cual ejecutó las siguientes acciones en forma automática: **a)** apertura de archivos .czi y **b)** separación en los diferentes canales de fluorescencia, **c)** conversión a formato digital de 8 bits con profundidad de píxeles 0-255, **d)** segmentación digital y generación de máscaras binarias, **e)** creación de un marco negro del tamaño del campo de la imagen para realizar la medición de la región no-núcleo (citoplasma) y creación de máscaras binarias, **f)** selección y registro de regiones de interés (*ROIs*) para núcleo y no núcleo y almacenamiento de sus coordenadas en archivos en formato zip.*ROI*, **g)** apertura de las *ROIs* en las imágenes originales por canal de fluorescencia, **h)** conteo de núcleos por tratamiento y medición de las áreas e intensidades de las señales en núcleo y citoplasma y **i)** registro de datos en planillas digitales.

3) La determinación del número de células en sus diferentes condiciones se realizó empleando el *plugin cell counter*. Se registraron los datos en una plantilla de Excel para crear una matriz de extensión texto delimitado por tabulaciones (.txt) y posteriormente analizar estadísticamente en el programa R.

Posteriormente, los datos fueron transferidos a planillas digitales de Excel (versión 2015/2019), agrupados por célula, tratamiento y localización subcelular de las marcas y luego transformados al formato “texto delimitado por tabulaciones.txt” requerido para emplear el programa R en los análisis estadísticos posteriores.

Colocalización entre foci de γ H2AX y foci de Ciclina D1

La colocalización de las señales de γ H2AX y Ciclina D1 se realizó sobre las imágenes digitales empleando el *plugins Coloc 2* del *software FIJI*, que calcula los coeficientes de Manders M1 (co-ocurrencia entre γ H2AX con señales de Ciclina D1) y M2 (co-ocurrencia entre Ciclina D1 con señales de γ H2AX) (Manders et al., 1993; Aaron et al., 2018) y los coeficientes de correlación *rho* de Spierman y *tau* de Kendall. Los coeficientes de Manders pueden variar entre 0 (no co-ocurrencia) a 1 (co-ocurrencia completa). Los valores de *Rho* y *Tau* varían entre -1 (correlación negativa), 0 (no correlación) y 1 (correlación positiva). Para que exista colocalización debe darse la situación de co-ocurrencia y correlación positiva entre las dos marcas y además, descartarse la posibilidad de que los valores obtenidos de los coeficientes se generen de manera aleatoria, lo cual se determina mediante el test de aleatorización de Costes, disponible en el Coloc 2. También se obtuvieron mapas de píxeles de colocalización entre γ H2AX y Ciclina D1. Las señales se obtuvieron empleando el *plugins Colocalización Threshold* de FIJI. En todos los casos, el nivel de significación estadística se determinó en $p < 0.05$.

Cuantificación de nanotubos (NT)

Sobre las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) a 3000x se generaron máscaras binarias (tipo Huang) de células individuales por tratamiento (n=25), a partir de las mismas se procedió con el conteo de filamentos utilizando el *plugins Cell counter* de FIJI. La medición de los parámetros largo y ancho de los filamentos se realizó utilizando, respectivamente 2 vectores: (a) un vector, trazado desde el borde del soma celular y (b) un segundo vector, trazado en sentido perpendicular al primero dibujados con la herramienta *Straight* del FIJI.

Cuantificación de vesículas extracelulares (VE) en el soma y en los NT

Se analizó la superficie de las células escaneadas utilizando MEB a 10.000-30.000x observando la aparición de partículas (VEs) de aspecto variable. Se generaron mascarar binarias (tipo *Huang*) por grupo experimental (n=25) y a partir de las mismas, se procedió a realizar el conteo de las VEs utilizando el *plugins Cell counter*, así como, la medición de sus diámetros mayores empleando la herramienta *Straight*, ambos contenidos en el FIJI. Se discriminó la ubicación en soma y/o sobre filamentos con el programa FIJI.

Generación de máscaras binarios de tipo esqueleto (esqueletización)

La esqueletización de imágenes MEB que muestran NT se realizó utilizando el correspondiente complemento de FIJI en imágenes MEB, de la siguiente manera: (i) convertir la imagen a 8 bits; (ii) aplicar la función de eliminación de manchas, cerrar y eliminar valores atípicos; (iii) guardar la imagen como un archivo separado; (iv) esqueletizar; (v) comparar con la figura original.

Análisis estadístico

1) Cálculo de *Odds ratio* en el recuento de núcleos con foci (OR, biblioteca “*epiR*” y “*MASS*”), que expresa la potencia de la asociación entre una exposición (EtOH y/o CTS) y el daño genético (foci de γ H2AX) generado por la misma. Se calcularon los valores de OR, su intervalo de confianza (IC) de 95%, el error estándar de OR y el *valor-p* del *test OR de McNemar’s chi squared* entre astrocitos expuestos y controles. El OR representa la razón entre la ocurrencia (núcleos con foci γ H2AX) versus la no ocurrencia del daño genético primario (núcleos sin foci γ H2AX).

También se utilizaron herramientas de complemento del programa Excel-2016/2019 del paquete Office 360 de Microsoft para Mac en la creación de matrices de datos y tablas comparativas de *valores-p*. En todos los casos se consideró un α de 5%.

Utilizando el software GraphPad Prism 8® (GraphPad Prism, RRID: SCR_002798), se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk ($\alpha \leq 0.05$) para comprobar las distribuciones normales de las siguientes variables: (i) número de foci de γ H2AX, (ii) áreas de astrocitos (iii) frecuencias de NTs y VEs, (iv) frecuencia de VEs en somas o NTs, (v) eje mayor de VEs y (vi) longitud y diámetro de NTs, todos considerados por astrocito. Dado que ninguno de ellos se ajustó a distribuciones normales, se describieron empleando las medianas y los intervalos de confianza del 95%, como medidas de resumen. En consecuencia, las diferencias entre las distintas condiciones experimentales (MC vs DMSO; MC vs EtOH; DMSO vs CTS; EtOH vs CTS; EtOH vs EtOH+CTS y CTS vs EtOH+CTS) se

analizaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples prueba post hoc (Prueba de Dunn).

En todos los casos, se analizaron entre 150 y 500 astrocitos de cada experimento y las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando $\alpha \leq 0.05$. Dado que cada condición se implementó por triplicado, las medianas de cada variable por grupo se compararon entre sí y los datos se agruparon cuando los valores de p fueron ≥ 0.05 . Los gráficos se realizaron empleando el software GraphPad Prism 8® y junto a las Figuras procesadas en el *FIJI*, se organizaron para armar las figuras, empleando el software Adobe Photoshop.

RESULTADOS

Determinación de las concentraciones de EtOH y CTS

Con el fin de conocer si EtOH y/o CTS eran capaces de inducir daño genético en astrocitos hipocampales, se realizaron experimentos a distintas concentraciones para detectar el daño genético a través de la expresión nuclear de pequeños agregados o foci de γ H2AX (Figura 3). Para evaluar el daño genético, en los primeros experimentos se utilizó como control positivo, el radiomimético bleomicina (BLEO). De acuerdo a nuestra experiencia previa en el Laboratorio, la concentración empleada de BLEO fue 2.5 μ g/mL (1 h de exposición). Como era esperable, el análisis cuantitativo de imágenes confocales mostró que el 94% de los astrocitos tratados con BLEO presentaba foci de γ H2AX.

Para determinar la concentración de EtOH y CTS, se incubaron cultivos confluentes de astrocitos del hipocampo previamente mantenidos en DMEM - 2% FBS durante 24 h con 0, 0.5, 1, o 2 μ mol/L de CTS o 0, 100, 200, 400, 600 mmol/L de EtOH durante 1 h (Figura 3). Realizados los ensayos oportunos se seleccionaron las concentraciones 400 mmol/L de EtOH y 1 μ mol/L de CTS por ser las concentraciones más bajas con capacidad de generar daño en el ADN y que éste fuera significativamente mayor a los controles (estadístico de Kruskal-Wallis: 59.66, 41.64 para EtOH y CTS, respectivamente y $p < 0.0001$ en ambos casos), cuantificable y reproducible como foci de γ H2AX en el contexto de la cromatina.

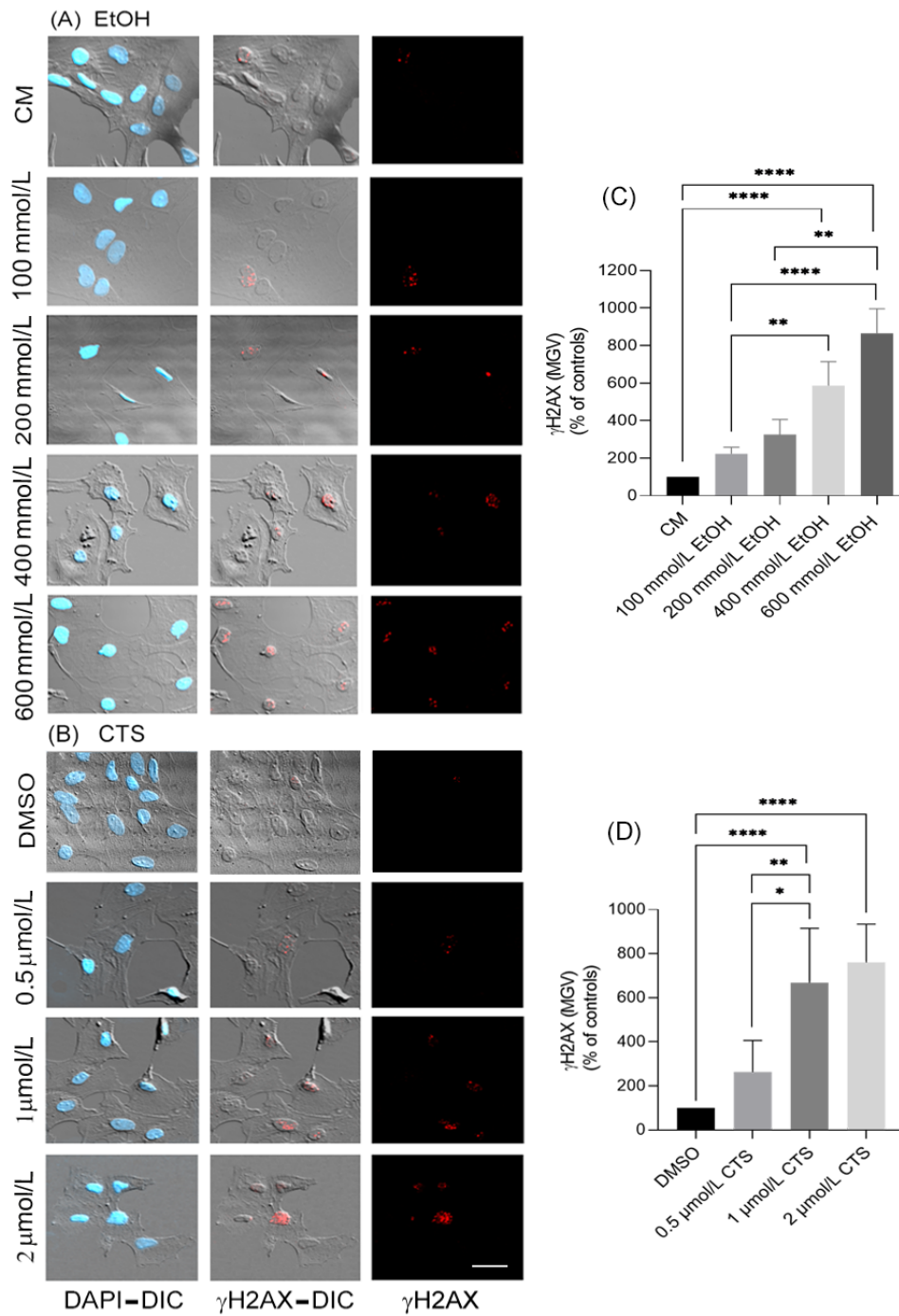


Figura 3.- Daño primario del ADN inducido por concentraciones crecientes de EtOH y/o CTS. (A, B) Imágenes de astrocitos obtenidas con contraste de fase con DIC (contraste de interferencia diferencial) e inmunofluorescencia que revelan la presencia de foci de γ H2AX (rojo) inducidos en la cromatina por 0 - 800 mmol/L de EtOH (A) o 0 - 2 μ mol/L de CTS luego de 1 h de incubación. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Barra de calibración: 10 μ m. (C, D) Intensidad media de fluorescencia (MGV) de foci de γ H2AX inducida por CTS (C) o EtOH (D) que evidencian una respuesta dependiente de la concentración. Las diferencias entre grupos se evaluarán mediante Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples. Prueba de

Dunn. Sólo se representaron diferencias estadísticas. Se analizó un total de 250 células por condición en tres experimentos independientes. MC: medio de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: co-tratamiento con EtOH y CTS. El número de asteriscos indica valores de p inferiores a 0.05 (*), 0.01 (**), 0.0001 (****).

Daño inducido en el ADN por EtOH y/o CTS

La fosforilación de la histona nucleosómica H2AX es uno de los eventos tempranos de la DDR, por tal motivo, se le denominada “la guardiana del genoma” ya que sufre una de las primeras modificaciones post-traduccionales en respuesta al daño inducido, señalizando el sitio y amplificando su señal (Reyes-Ábalos et al., 2024).

En las Figuras 3 y 4 se observa que los foci de γ H2AX, se presentaron como agregados nucleares específicos (rojo) ya que las imágenes de DIC muestran ausencia de foci a nivel del citoplasma (Figura 3A y 4A), siendo más abundantes en número (Figura 4B) y con mayor área (Figura 4C) e intensidad (MGV, Figuras 3B, 3C y 4D) en astrocitos tratados con EtOH, CTS o EtOH+CTS que en los controles pero, como se observa en la Figura 4B, 4C y 4D, estos parámetros presentan valores similares al comparar la co-exposición con cada incubación individual ($p > 0.05$). Los valores de p obtenidos al comparar los grupos EtOH, CTS y EtOH+CTS con sus correspondientes controles fueron respectivamente los siguientes: 0.0212, 0.0340, 0.0005, para la frecuencia de foci; 0.0286, 0.0280, 0.0270, para el área; y <0.0001 , <0.0001 , 0.0005, para la intensidad.

La estadística de Kruskal-Wallis para la frecuencia, el área y el MGV de los foci de γ H2AX fue 32.57, 14.96 y 15.55, respectivamente, mientras que los valores de p respectivos fueron $p < 0.0001$, $p=0.0048$ y $p=0.0037$. Como evidencian las imágenes DIC- γ H2AX combinadas con DIC-DAPI (Figura 3 y 2). El análisis estadístico de Kruskal-Wallis de los datos de frecuencia y MGV de γ H2AX en la curva dosis-respuesta indica valores 59.66 y 41.64 para EtOH y CTS, respectivamente, con $p < 0.0001$ en ambos casos, validando las concentraciones de trabajo definidas.

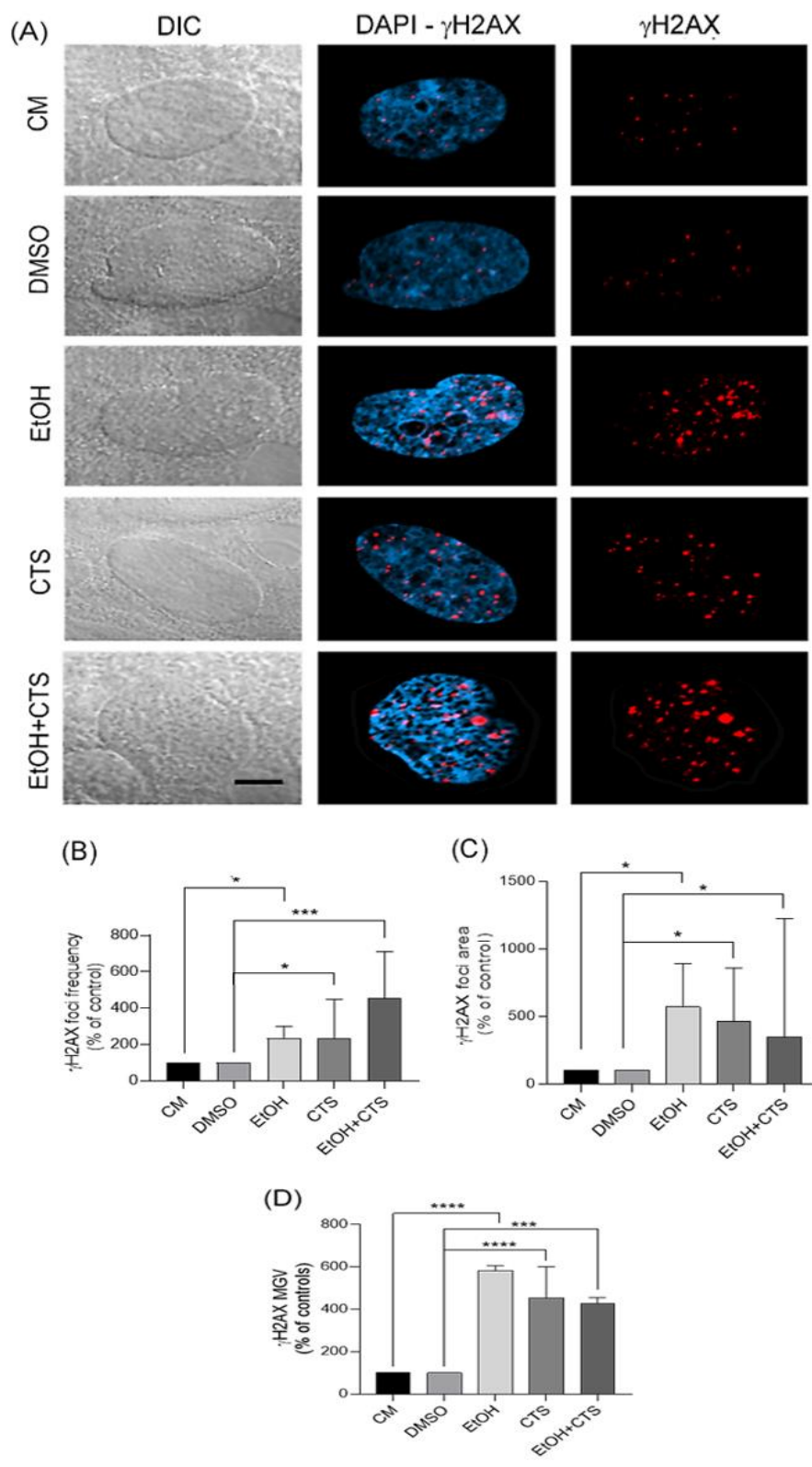


Figura 4.- Daño genético primario del ADN inducido por 400 mmol/L de EtOH y/o 1 μ mol/L de CTS. **(A)** Contraste de fase por interferencia diferencial (DIC) e imágenes confocales que evidencian los sitios de daño del ADN nuclear reconocidos como foci γ H2AX (rojo). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Barra de

calibración: 5 μm . **(B-D)** Frecuencia (B), área (C) y MGv (D) de foci de γH2AX expresados como porcentajes respecto a los correspondientes controles. En todos los parámetros analizados, las exposiciones a EtOH, CTS y EtOH+CTS indujeron aumentos significativos respecto a los controles, pero no hubo diferencias entre ellos. Se analizaron 250 células por condición en siete experimentos independientes. MC: medio de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: co-tratamiento con EtOH y CTS. Las diferencias entre grupos se evaluarán mediante Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples Prueba de Dunn. El número de asteriscos indica valores de p inferiores a 0.05 (*), 0.001 (***) o 0.0001 (****).

Para evaluar la probabilidad de aparición de daño genético primario inducido (núcleos con foci de γH2AX) en los astrocitos inducidos por los distintos tratamientos, respecto a la ausencia de tratamiento. Se realizó un estudio de tipo exposición-respuesta a través del cálculo de *Odds ratio* (OR; utilizando R). La probabilidad de daño astrocítico analizada por la medición del OR (con rango y valores p), que evalúa la presencia y ausencia de foci de γH2AX en todas las condiciones experimentales, indica una mayor probabilidad de daño asociado con EtOH y/o CTS que en su ausencia (Tabla 3).

La medida del efecto asociado a la exposición de EtOH y/o CTS dio significativamente mayor probabilidad de generar daño inducido en el ADN que ante la ausencia de ambas drogas (OR = 4.15). Además, cabe destacar que, la exposición a EtOH aislada y/o combinada con CTS provocó mayor recuento de foci de γH2AX por núcleo astrocitario que CTS.

Tabla 3.- Probabilidad de daño genético medido con *Odds ratio* (OR) en astrocitos tratados *versus* controles. Los valores de OR, del intervalo de confianza (IC) de 95% y de p , evidencian que la probabilidad de daño, provocado por la exposición a EtOH y/o CTS, fue mayor que en ausencia de dichos tratamientos. Los valores se obtuvieron mediante la comparación del número de núcleos con y sin foci de γH2AX .

Condiciones Experimentales	OR	IC 95%	valor p	Probabilidad de daño en el ADN asociado con EtOH y/o CTS
EtOH vs CM	2.53	1.94 - 3.29	0.0001	Daño asociado a EtOH
CTS vs DMSO	1.48	1.16 - 1.89	0.0001	Daño asociado a CTS
EtOH vs CTS	1.90	1.43 - 2.52	0.0001	+ Daño asociado a EtOH y CTS
EtOH+CTS vs EtOH	1.80	1.35 - 2.43	0.0001	Daño
EtOH+CTS vs CTS	2.80	2.12 - 3.69	0.0001	Daño
EtOH+CTS vs DMSO	4.15	3.17 - 5.43	0.0001	++ Daño asociado a EtOH y CTS

Activación de la DDR tras la incubación con EtOH y/o CTS

CICLINA D1

La Ciclina D1 es una proteína del control de ciclo celular, vinculada a su reactivación y a la reparación de RDC del ADN en células neurales (Tchakarska & Sola., 2020).

Analizamos la inmunorreactividad de la Ciclina D1 (Figura 5) y encontramos que todas las condiciones experimentales presentaban diferentes intensidades de señal en los compartimentos nuclear (DAPI, azul) y citoplasmático (DIC, gris) (Figura 5A). Las imágenes DIC evidencian claramente que las señales son específicas, están restringidas al núcleo y al citoplasma de los astrocitos. La evaluación de la intensidad media (MGV) de la Ciclina D1 nuclear (Figura 5B) indicó que mientras el grupo EtOH no difirió de su control CM ($p = 0.9580$), MGV de CTS fue menor a su control DMSO ($p < 0.0001$) y que el grupo EtOH+CTS mostró un valor intermedio al comparar su MGV con el de las noxas individuales ($p < 0.0001$). En cuanto a la intensidad media (MGV) de la Ciclina D1 citoplasmática (Figura 3C) sólo MGV del grupo EtOH mostró valores, superiores a los controles y a los grupos CTS y EtOH+CTS ($p < 0.0001$ en ambos casos) mientras que, no hubo diferencias entre ambos grupos, pero los valores de MGV de ambos, fueron más bajos que el de los controles respectivos ($p > 0.05$).

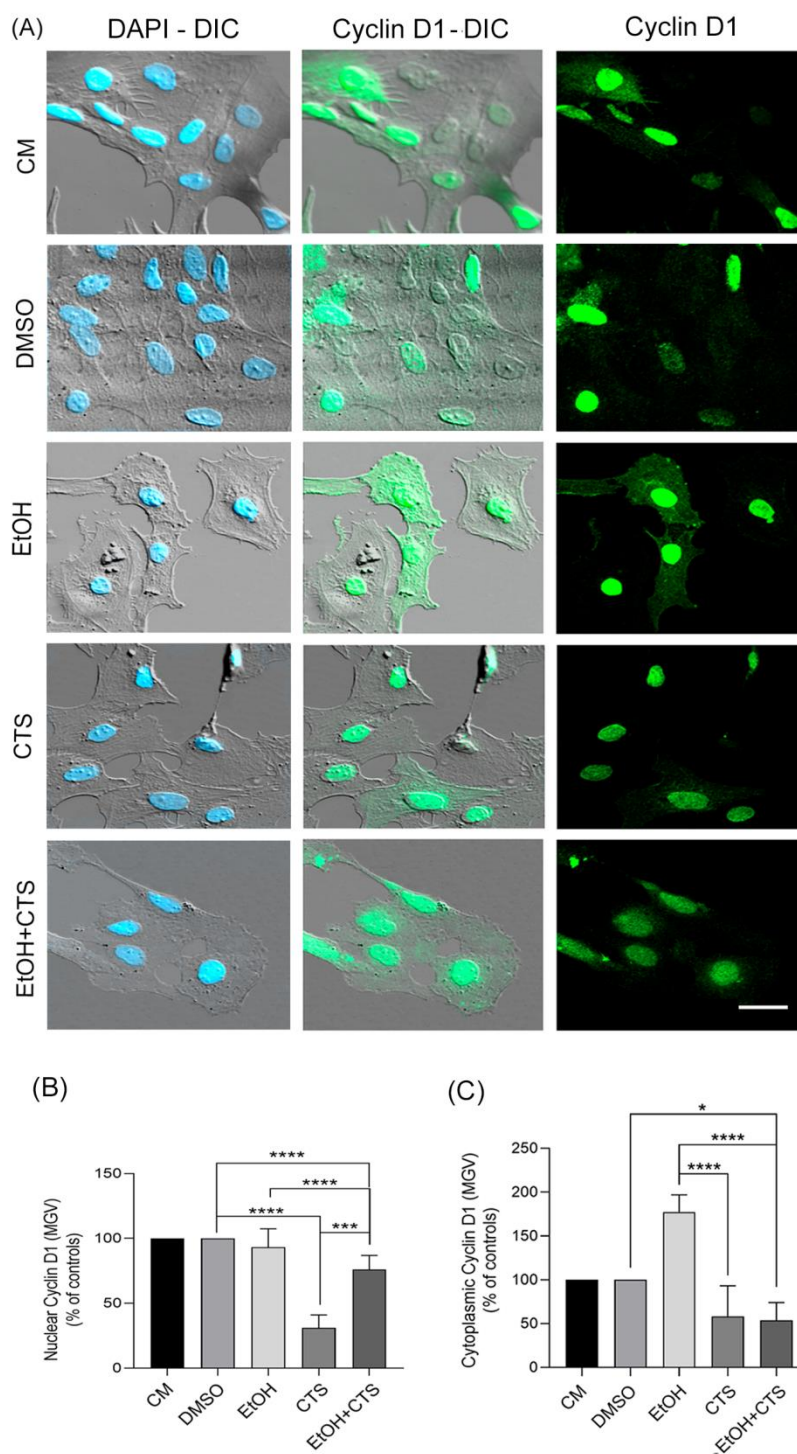


Figura 5.- Cambios en la inmunorreactividad de la Ciclina D1 después de la exposición a EtOH y/o CTS. **(A)** Imágenes DIC y confocal de Ciclina D1 nuclear y citoplasmática (verde) en todas las condiciones experimentales. Obsérvese la mayor intensidad nuclear y la apariencia de agregados de diferente tamaño e intensidad. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Barra de calibración: 10 μ m. **(B, C)** Intensidad media por número de píxeles (MGV) de la Ciclina D1 nuclear y citoplasmática expresadas como porcentajes de los

controles, en todas las condiciones experimentales. Respecto a la Ciclina D1 nuclear no hubo cambios con EtOH, pero sí una reducción significativa en la exposición a CTS y valores intermedios en la condición EtOH+CTS. La MGV de la Ciclina D1 citoplasmática no cambió en las exposiciones individuales, pero decreció con EtOH+CTS en relación a los controles. Se analizaron 250 células por condición en cinco experimentos independientes. Las diferencias entre grupos se evaluarón mediante Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples Prueba de Dunn. MC: medio de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: co-tratamiento con EtOH y CTS. Las diferencias entre grupos se evaluarón mediante Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples Prueba de Dunn. El número de asteriscos indica valores de p inferiores a 0.05 (*), 0.001 (***) o 0.0001 (****).

Como se muestra en los mapas de colocación de píxeles para cada condición (Figura 6) los foci γ H2AX (rojo) y las marcas de Ciclina D1 nuclear (gris) tuvieron tendencia a colocalizar. Las áreas de superposición de ambas marcas aumentaron en los astrocitos tratados con EtOH, CTS y EtOH+CTS en comparación con los controles, pero no difirieron entre los grupos tratados (Figura 6 A-D). Los valores de los coeficientes de correlación de Manders (Figura 6B, C), sugieren que las marcas de γ H2AX y Ciclina D1 poseen una tendencia mayor a colocalizar en los astrocitos tratados que en los controles, aunque sólo fue significativa la diferencia del coeficiente M2 entre CTS y su control DMSO ($p < 0.05$). Los coeficientes *rho* y *tau* (Figura 6D) indicaron una correlación entre las marcas de γ H2AX y Ciclina D1 significativamente mayor en los astrocitos expuestos a EtOH y CTS, que en sus respectivos controles. Asimismo, se observó una tendencia al incremento de *rho* y *tau* en el grupo EtOH+CTS, respecto a ambos controles, sin detectarse diferencias entre los tres grupos expuestos.

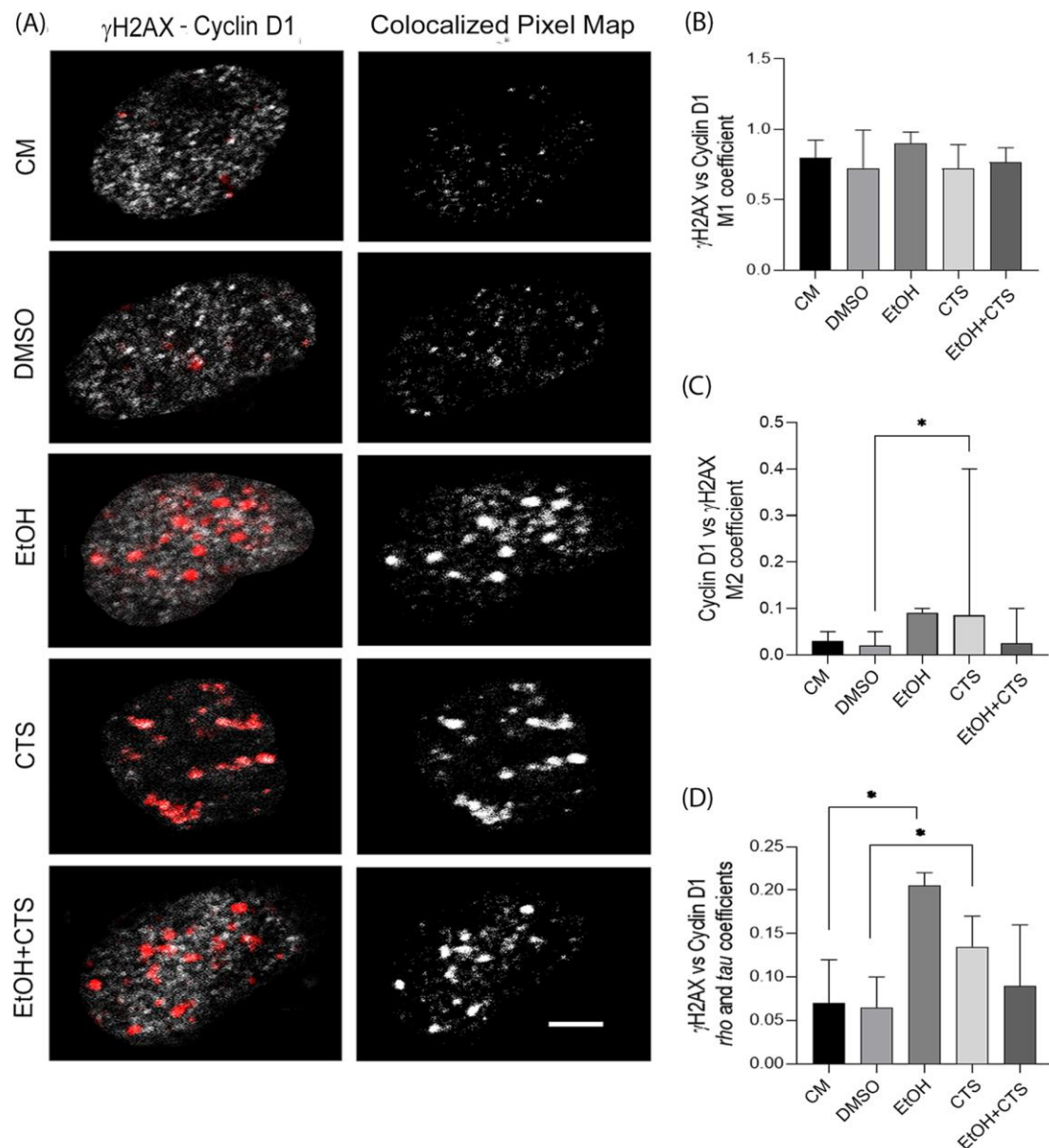


Figura 6.- Colocalización de γ H2AX y Ciclina D1 tras la incubación con EtOH y/o CTS. **(A)** A izquierda, imágenes confocales de células individuales que muestran núcleos astrocitarios con foci de γ H2AX (rojo) y señales de Ciclina D1 (blanco). A derecha, mapas de píxeles de colocalización entre ambas marcas nucleares (gris/blanco) en todas las condiciones experimentales. Barra de calibración: 5 μ m. **(B-D)** Evaluación la colocalización utilizando coeficientes de co-ocurrencia de Manders M1 y M2 (B, C) y de correlación ρ de Spierman y τ de Kendall (D). Se observa una tendencia al aumento de la co-ocurrencia y correlación de marcas de γ H2AX y Ciclina D1 en los grupos EtOH y EtOH+CTS con un aumento significativo de M2 en el grupo CTS respecto a los controles (C) y mayor correlación entre ambas marcas con los respectivos controles en los grupos expuestos a EtOH y CTS y sólo una tendencia al incremento en el caso de EtOH+CTS (D). Se analizaron 100 células en tres experimentos independientes. Las diferencias entre grupos se evaluarán mediante Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples Prueba de Dunn. MC: medio de cultivo, DMSO:

dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS. El número de asteriscos indica valores de p inferiores a 0.05 (*).

APE1

APE1 (Apurinic/apyrimidinic Endonuclease 1) es una proteína de reparación con función canónica de endonucleasa hidrolítica de la vía de reparación por escisión de nucleótidos (Base Excision Repair, BER) (Tosolini et al., 2020).

En cuanto a la inmunorreactividad de APE1 (Figura 7A), fue positiva (magenta) tanto en el núcleo como en el citoplasma astrocitario, en todas las condiciones experimentales, pero la señal nuclear predominó claramente sobre la citoplasmática. El análisis de MGv de APE1 nuclear (Figura 7B), evidenció valores significativamente mayores en los grupos expuestos a EtOH, CTS y EtOH+CTS que en los controles ($p < 0.0001$, en todos los casos). Asimismo, el valor de MGv en el caso de co-exposición fue mayor que en los casos de exposición independiente ($p = 0.0029$ y $p < 0.0001$; para EtOH y CTS, respectivamente). Respecto a MGv de APE1 citoplasmático (Figura 7C), los valores en astrocitos tratados con EtOH y EtOH+CTS fueron significativamente mayores que en los controles ($p = 0.0145$ y $p = 0.0004$, respectivamente). También se observó que en astrocitos tratados con EtOH+CTS, MGv fue significativamente mayor que en aquéllos tratados con CTS ($p < 0.0001$). La estadística de Kruskal-Wallis para APE1 nuclear y citoplasmática fue 150.8 y 130.5, con $p < 0.0001$ en ambos casos.

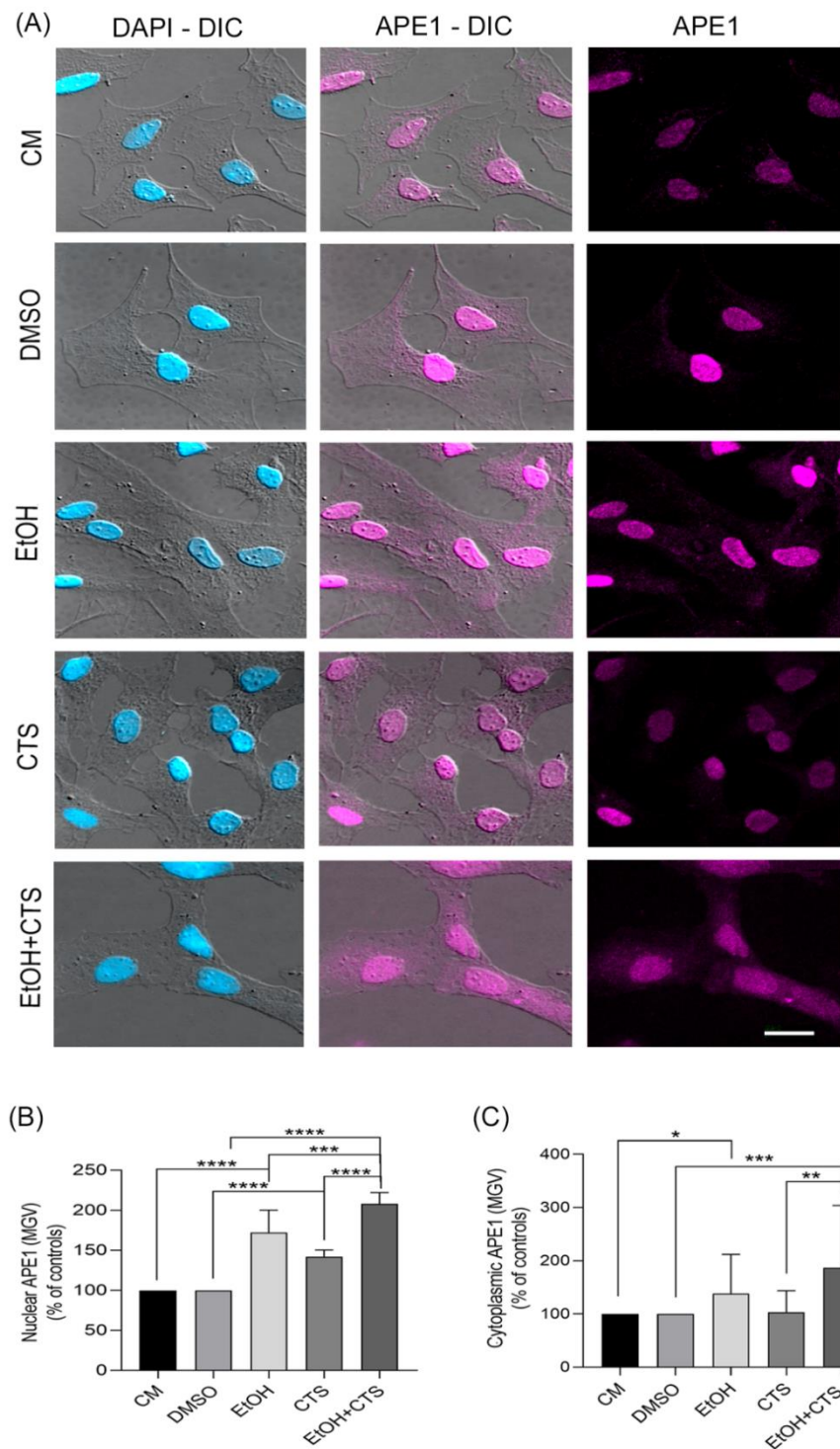


Figura 7.- Inmunorreactividad de la APE1 luego de la exposición a EtOH y/o CTS. **(A)** DIC e imágenes confocales que muestran APE1 nuclear y citoplásmico (fucsia) en todos los grupos experimentales. Se distingue la clara prevalencia de la tinción nuclear que aparece como pequeños agregados. Barra de calibración: 10 μ m. **(B, C)** MGV de APE1 nuclear y citoplasmático en todos los grupos experimentales. Se observaron valores significativamente mayores de APE1 nuclear en las condiciones de exposición a EtOH,

CTS y EtOH+CTS, siendo la co-exposición mayor que la de EtOH o CTS solos. La MGv de APE1 citoplasmático fue significativamente mayor ante la presencia de EtOH, que en su control (CM) y siendo EtOH+CTS la condición con los valores de MGv más altos y significativos respecto a CTS y control DMSO. Se analizaron al menos 250 células por condición en cinco experimentos independientes. MC: medio de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS. Las diferencias entre grupos se evaluarón mediante Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples Prueba de Dunn. El número de asteriscos indica valores de p inferiores a 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***) o 0.0001 (****).

BAX

BAX (Bcl-2-like protein 4) es una proteína de la vía apoptótica intrínseca involucrada en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa con liberación del citocromo C y activación de caspasas, por lo cual se considera una marca de apoptosis celular (Lindenboim et., 2013).

Los astrocitos mostraron una mayor inmunorreactividad de BAX nuclear y citoplasmática en condiciones de lesión. Las imágenes confocales obtenidas de astrocitos inmunomarcados para detectar BAX (Figura 8) mostraron señales tanto nucleares como citoplasmáticas, pero predominantes a nivel nuclear. El análisis de MGv demostró que las señales de BAX aumentaron tanto en el citoplasma (Figura 8B) como en los dominios nucleares (Figura 8B) de los astrocitos expuestos a EtOH y/o CTS en relación con sus respectivos controles ($p < 0.0001$, en ambos casos). En los dos compartimentos, el valor de MGv de BAX más alto correspondió a las exposiciones combinadas de EtOH y CTS (92.92, 186.3), mientras que no se observaron diferencias entre los controles ($p > 0.05$). Además, se observó que las señales de BAX tienden a excluir regiones heterocromáticas intensas en DAPI en todas las condiciones experimentales.

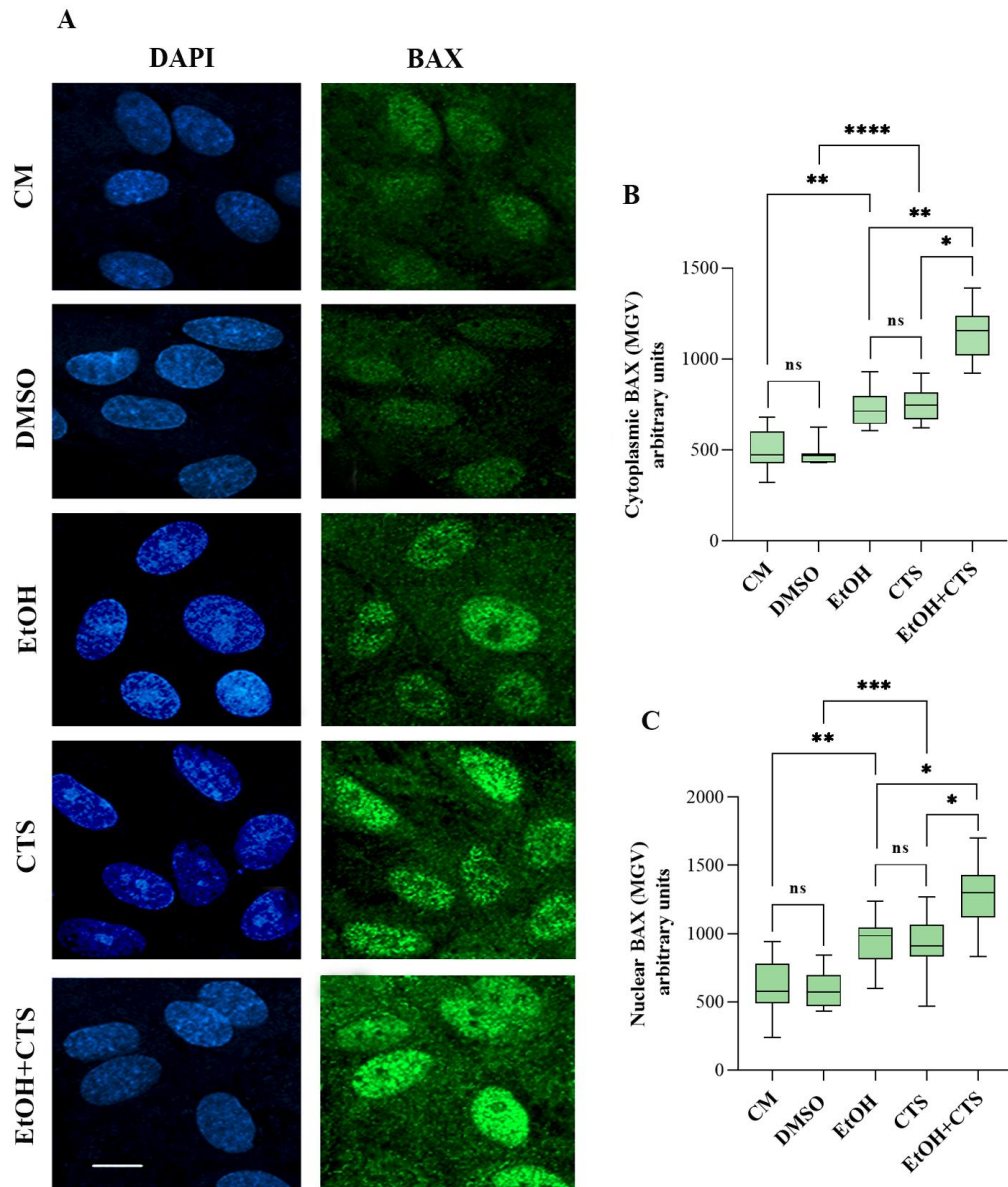


Figura 8.- Incremento de la inmunorreactividad de BAX luego de la exposición a EtOH y/o CTS **(A)** Imágenes confocales de astrocitos tratados y controles que muestran inmunotinción de BAX (verde). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Barra de calibración: 10 μ m. **(B, C)** Distribución de señales de BAX en el citoplasma **(B)** y núcleo **(C)** de astrocitos de las diferentes condiciones experimentales. Las líneas horizontales dentro de los cuadros representan la mediana. Las diferencias entre 100 astrocitos por grupo se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de la prueba de Dunn, (****: $p < 0.0001$; ****: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: $p > 0.05$). MC: medio de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS. MGv: valor medio de intensidad de fluorescencia (grises).

Análisis del estado de activación de los astrocitos

GFAP

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) se encuentra en los astrocitos y es un marcador específico de astrogliosis reactiva, la marcación de GFAP aumenta señalando cambios de la estructura celular en el contexto de una alteración del SN, como respuesta a una injuria o lesión traumática (Verkhatsky et al., 2023).

El análisis de la inmunorreactividad de GFAP en todas las concentraciones empleadas reveló aumentos en su intensidad media de fluorescencia (MGV), tras los tratamientos con EtOH y/o CTS, pero con ausencia de signos claros de reactividad, excepto al tratar los astrocitos con 800 mmol/L de EtOH, cuando comenzaron a mostrar signos morfológicos de reactividad como contracción del cuerpo celular y procesos celulares largos (Figura 9). El análisis estadístico de los datos de GFAP obtenidos en relación a las diferentes concentraciones de EtOH y/o CTS, mostró valores de Kruskal-Wallis de 95.58 y 35.93 para EtOH y CTS, respectivamente; con $p < 0.0001$, en ambos casos, confirmando aumentos significativos asociados a las concentraciones de EtOH y/o CTS.

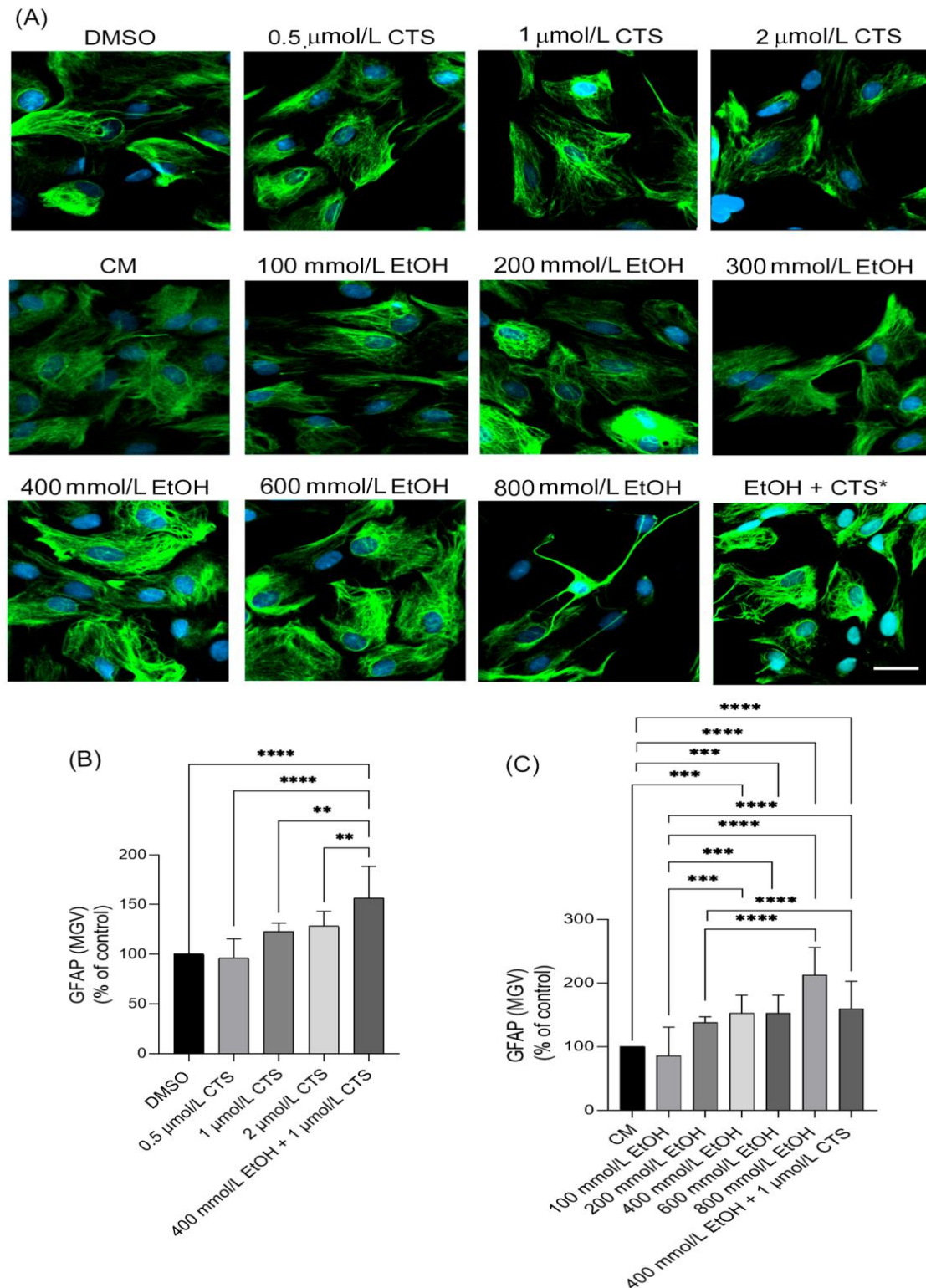


Figura 9.- Inmunorreactividad de GFAP al aumentar las concentraciones de EtOH o CTS. **(A)** Imágenes confocales de la señal GFAP (verde) después de 1h de incubación con 0-2 μmol/L de CTS o 0 - 800 mmol/L de EtOH, lo que revela la ausencia de cambios morfológicos significativos, excepto a 800 mmol/L. Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Barra de calibración: 5 μm. **(B, C)** MGv de GFAP determinado con diferentes concentraciones de CTS **(B)** o EtOH **(C)**, expresados como porcentaje de los controles respectivos.

Se observaron aumentos significativos de MGv de manera paralela al aumento en las concentraciones de EtOH y/o CTS. Las barras muestran la mediana con 95% intervalo de confianza. Las diferencias entre grupo se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de la prueba de Dunn. Sólo se representaron las comparaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El número de asteriscos indica valores de p inferiores a 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***), 0.0001 (****). Se analizó un total de 150 células por condición en tres experimentos separados. MC: medio de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS. MGv: valor medio de intensidad de fluorescencia (grises).

S100 β

S100 β es una proteína de unión a Ca^{2+} del tipo EF-hand que muestra alta expresión en los astrocitos y se encuentra relacionada en la regulación de varias actividades intracelulares, incluidas la proliferación y la diferenciación celular (Donato et al., 2009).

Se evaluó la inmunorreactividad de S100 β tras la exposición a 400 mmol/L de EtOH y/o 1 $\mu\text{mol/L}$ de CTS (Figura 10). No se identificaron cambios detectables en la morfología o en el número de células en ninguna de las condiciones experimentales (Figura 10A), como se observó con GFAP. Sin embargo, las imágenes obtenidas mostraron señales elevadas de S100 β de localización nuclear y citoplasmáticas en todas condiciones de tratamiento. Los astrocitos expuestos a EtOH, CTS o EtOH+CTS presentaron mayor MGv de S100 β tanto nuclear como citoplasmático, respecto a los controles (Figura 10B), pero sin diferencias entre cada uno de estos grupos (Figuras 10B, C). La estadística de Kruskal-Wallis para S100 β nuclear y citoplasmático fueron 108.1 y 119.9 respectivamente, con $p < 0.0001$ en ambos casos.

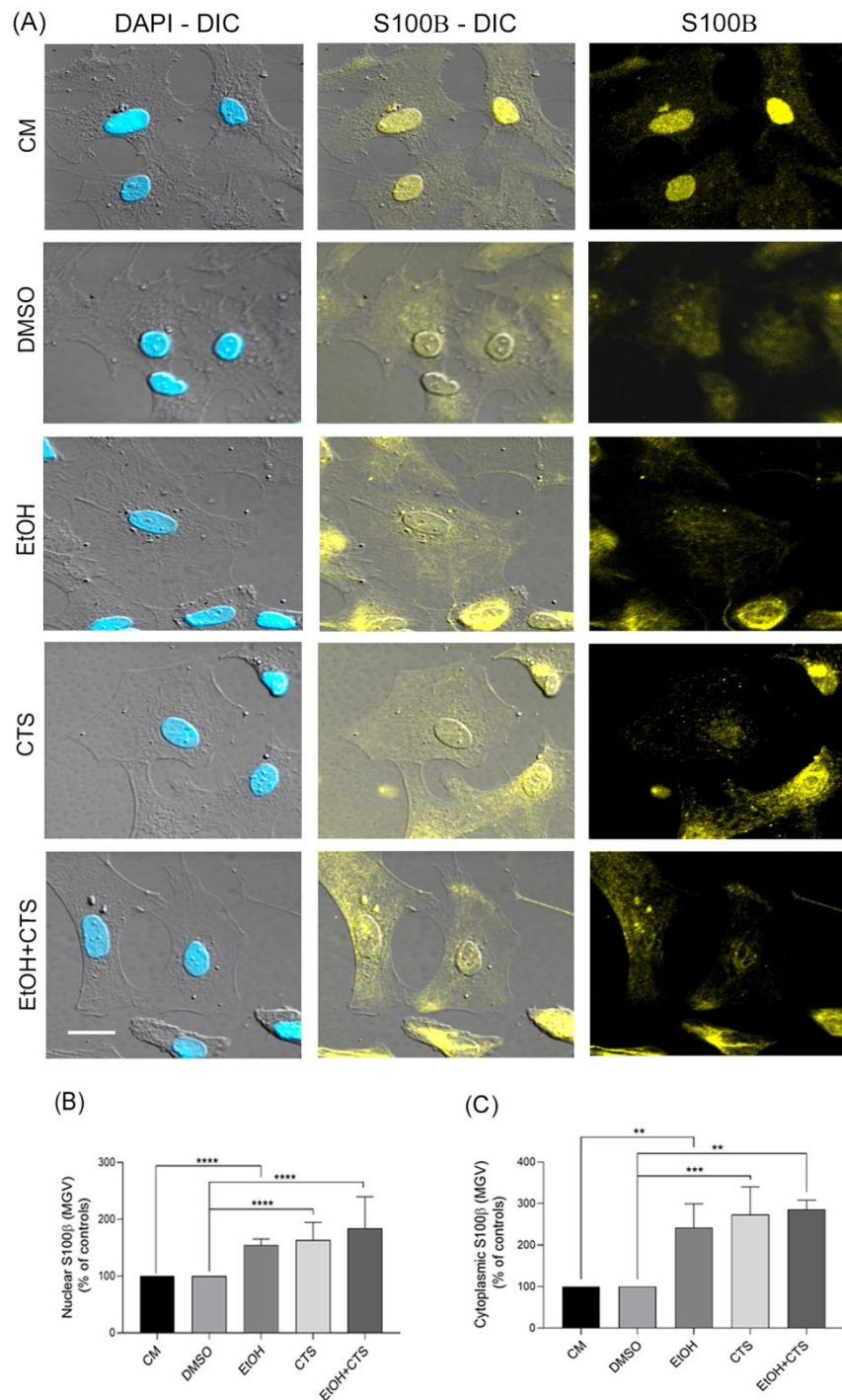


Figura 10.- Inmunorreactividad de S100 β ante la exposición a EtOH y/o CTS. (A) DIC e imágenes confocales de astrocytes. Se observan los núcleos coloreados con DAPI y las señales de S100 β (amarillo) en núcleos y citoplasma. Barras de calibración: 10 μ m. **(B, C)** MGv de S100 β en el núcleo (B) y el citoplasma (C). Tanto en el núcleo como en el citoplasma, el MGv de EtOH y/o CTS fue significativamente mayor que en los controles y sin diferencias entre los tratamientos. Se analizaron al menos 250 células por condición en cinco experimentos independientes. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-

Wallis con comparaciones múltiples de la prueba de Dunn. CM: medio de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS. MGv: valor medio de intensidad de fluorescencia (grises). El número de asteriscos indica valores de p inferiores a 0.01 (**), 0.0001 (***).

Citoesqueleto de actina evaluado con phalloidina

La marcación de Alexa 633-Falloidina (Figura 11) demostró que el citoesqueleto de actina F no presentó cambios en ninguna de las condiciones experimentales. Además, como se observa en las figuras obtenidas con DIC, los astrocitos no mostraron signos significativos de muerte celular o desprendimiento del sustrato para las concentraciones seleccionadas. Esto nos permite afirmar que los astrocitos no presentaron cambios significativos en su citoesqueleto de actina.

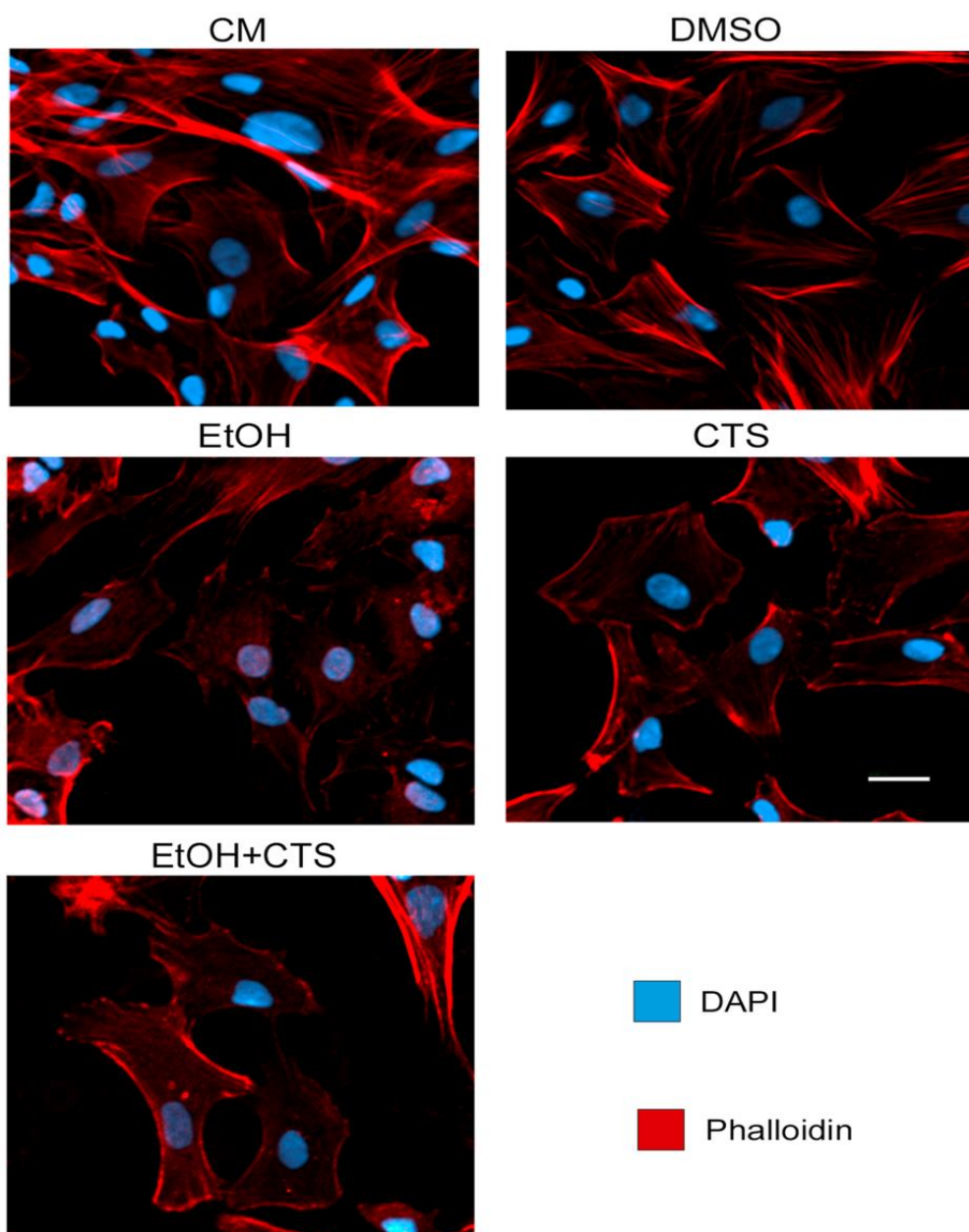


Figura 11.- Marcado del citoesqueleto de actina con faloidina para astrocitos expuestos a concentraciones de 400 mmol/L de EtOH y/o 1 μ mol/L de CTS y controles. Se observan imágenes confocales de señales de faloidina (rojo) sin cambios en la morfología celular y citoesqueleto de actina F en todas las condiciones experimentales. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Barra de calibración: 10 μ m. Se tomaron imágenes de 100 células, analizadas en tres experimentos independientes. CM: medio de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS.

Evaluación del número de nucléolos

El mayor número de nucléolos tras la incubación con EtOH y/o CTS es otro hallazgo importante (Figura 12). En las Figuras 12 A y 10 B se muestran las tinciones que permitieron identificar los nucléolos. Los nucléolos se observan como regiones DAPI-negativas, rodeadas por un área DAPI-intensa a su vez, la cual es positiva para el marcador de heterocromatina H3K27m3, que reconoce la lisina 27 trimetilada de la histona H3 (verde), y también positiva para ribonucleoproteína (ARNr y proteínas ribosómicas, rojo; Kun et al. 2007). La Figura 10 D muestra que las regiones centrales de los nucléolos carecen tanto de señales de DAPI (azul) como de H3K4m3 (blanco), una marca específica de eucromatina que reconoce la lisina 4 trimetilada de la histona H3. La cuantificación de la frecuencia de nucléolos (Figuras 12 C) demostró un mayor número de nucléolos en los astrocitos tratados con CTS que en los controles ($p = 0.0025$) y una tendencia a aumentar dicha frecuencia en astrocitos expuestos a EtOH y EtOH+CTS. La estadística de Kruskal-Wallis para el número de nucléolos fue de 18.62 con $p = 0.0009$.

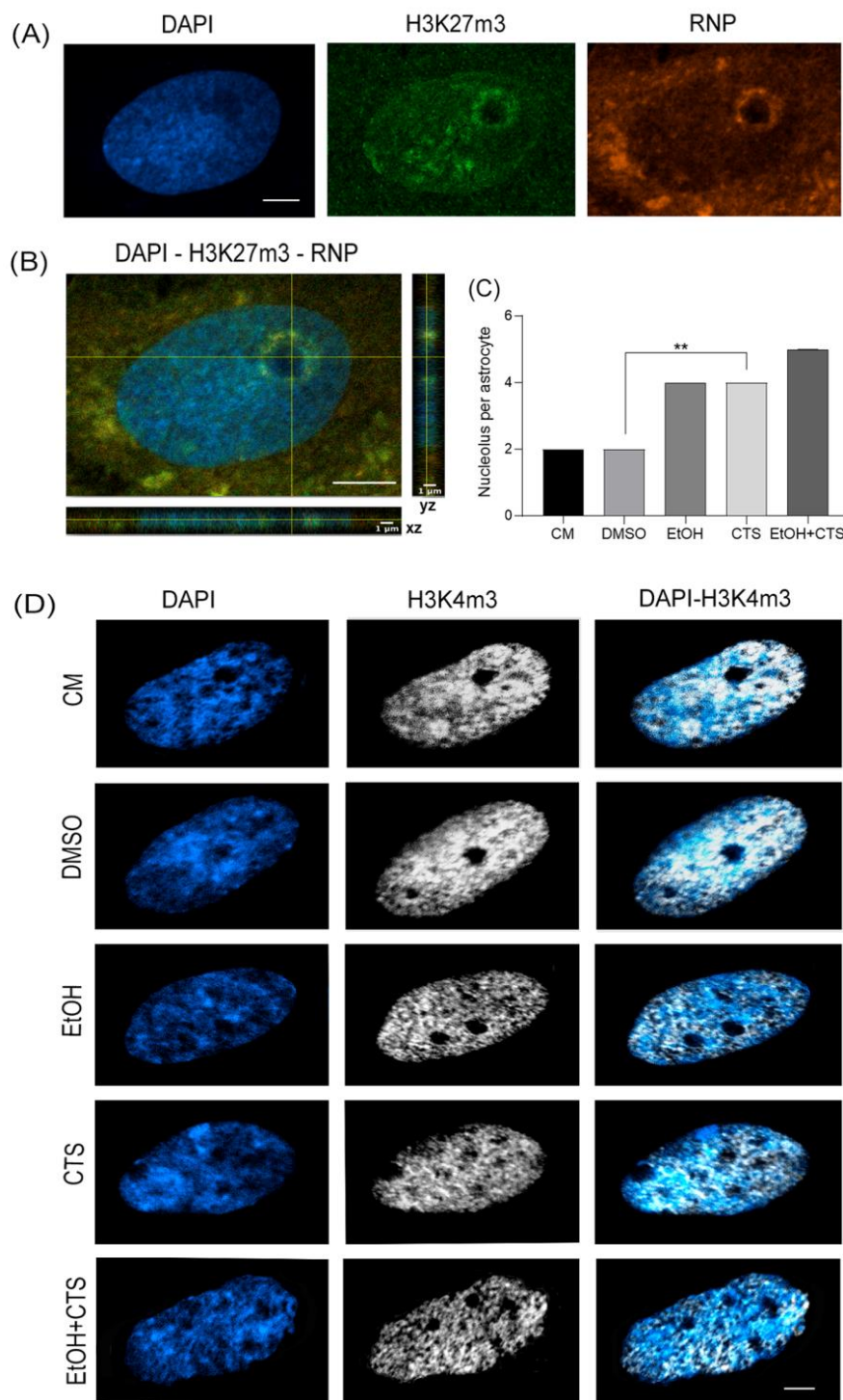


Figura 12.- Los nucléolos de astrocitos tras la incubación con EtOH y/o CTS. **(A)** Visualización del dominio nucleolar reconocido como una región DAPI-negativa rodeada por una región DAPI-intensa con señales positivas del marcador de heterocromatina (H3K27m3, verde) y señales de ribonucleoproteína (ARNr y proteínas ribosómicas; rojo). Barra de calibración: 5 μ m. **(B)** Planos de corte XY y ZX de imágenes confocales que apuntan a una región intranucleolo con señal central DAPI-negativo baja y margen DAPI-intenso (azul), con marcas heterocromáticas de H3K27m3 (verde) y ribonucleoproteína (rojo). **(C)** Frecuencias de nucléolos

por astrocito y grupo experimental. Se observó un aumento significativo de nucléolos en astrocitos expuestos a CTS ($p = 0.0025$) pero sin cambios significativos en los expuestos a EtOH o EtOH+CTS respecto a los controles ($p > 0.9999$ en ambos casos). **(D)** Regiones nucleolares en las distintas condiciones experimentales. Se observan los nucléolos carentes tanto de señales centrales de DAPI (azul) como de marcas eucromáticas de H3K4m3 (blanco) y el aumento de su número en los núcleos tratados respecto a los controles. Se analizaron al menos 75 células por condición en tres experimentos independientes. CM: medio de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS. MGv: valor medio de intensidad de fluorescencia (grises). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de la prueba de Dunn. El número de asteriscos indica valores de p inferiores a 0.01 (**).

Modulación de la comunicación astrocitaria vía nanotubos (NTs) y vesículas extracelulares (VEs)

Las imágenes MEB de todas las condiciones experimentales evidenciaron que los somas de astrocitos presentan en sus membranas estructuras que poseen las características de las VEs. Asimismo, se observaron múltiples especializaciones de membrana que se extendían desde los márgenes celulares, cuya longitud predominaba sobre la sección transversal y su apariencia era muy similar a los arreglos de NTs descritos previamente por Rustom et al. (2004).

Nanotubos

Los principales parámetros morfológicos de los NTs parecieron depender del tipo de lesión. Se pudieron distinguir dos tipos principales de especializaciones de la membrana celular (Figura 13). Un tipo de NTs compuesto por prolongaciones cortas e irregulares de diámetros similares en el punto de emersión, que disminuyen suavemente para terminar en un espacio libre de células (Figura 13A, asterisco verde). Otro tipo caracterizado por formaciones de diferentes longitudes y diámetros que parecen actuar como puentes intercelulares entre diferentes astrocitos o cruzar la superficie celular para conectar diferentes células (Figura 13A, asteriscos azules). A la derecha de cada imagen MEB (Figura 13B), se muestran las respectivas máscaras binarias esqueletizadas para evidenciar los dos tipos de procesos celulares mencionados, los que, con diferentes frecuencias, aparecen en todas las condiciones experimentales. Según la medida de la longitud (Figura 13C), los NTs más cortos aparecieron principalmente en ambas condiciones control ($p < 0.0001$ en todos los casos), mientras que los NTs más largos se encontraron sobre todo en los astrocitos tratados con EtOH o EtOH+CTS, mostrando valores de frecuencia intermedia en astrocitos expuestos a CTS ($p < 0.0001$, en todos los casos), existiendo diferencias significativas entre los tres grupos de tratamiento. En cuanto a los diámetros de NTs grupos (Figura 13D), el

mayor valor se observó en la condición EtOH, el mínimo en el grupo CTS y el intermedio en la condición co-expuesta, siendo significativas las diferencias entre los tres grupos y sus respectivos controles ($p < 0.0001$). Por lo tanto, la condición EtOH exhibe los NTs más largos y gruesos ($p < 0.0001$ y 0.01). Sin embargo, la evaluación de las relaciones longitud NT/diámetro NT en valores absolutos por condición, demostró que el mayor valor del cociente correspondía a CTS, seguido por la condición EtOH+CTS ($p < 0.0001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$) y luego por EtOH, con valores similares a los controles (Figura 13E)

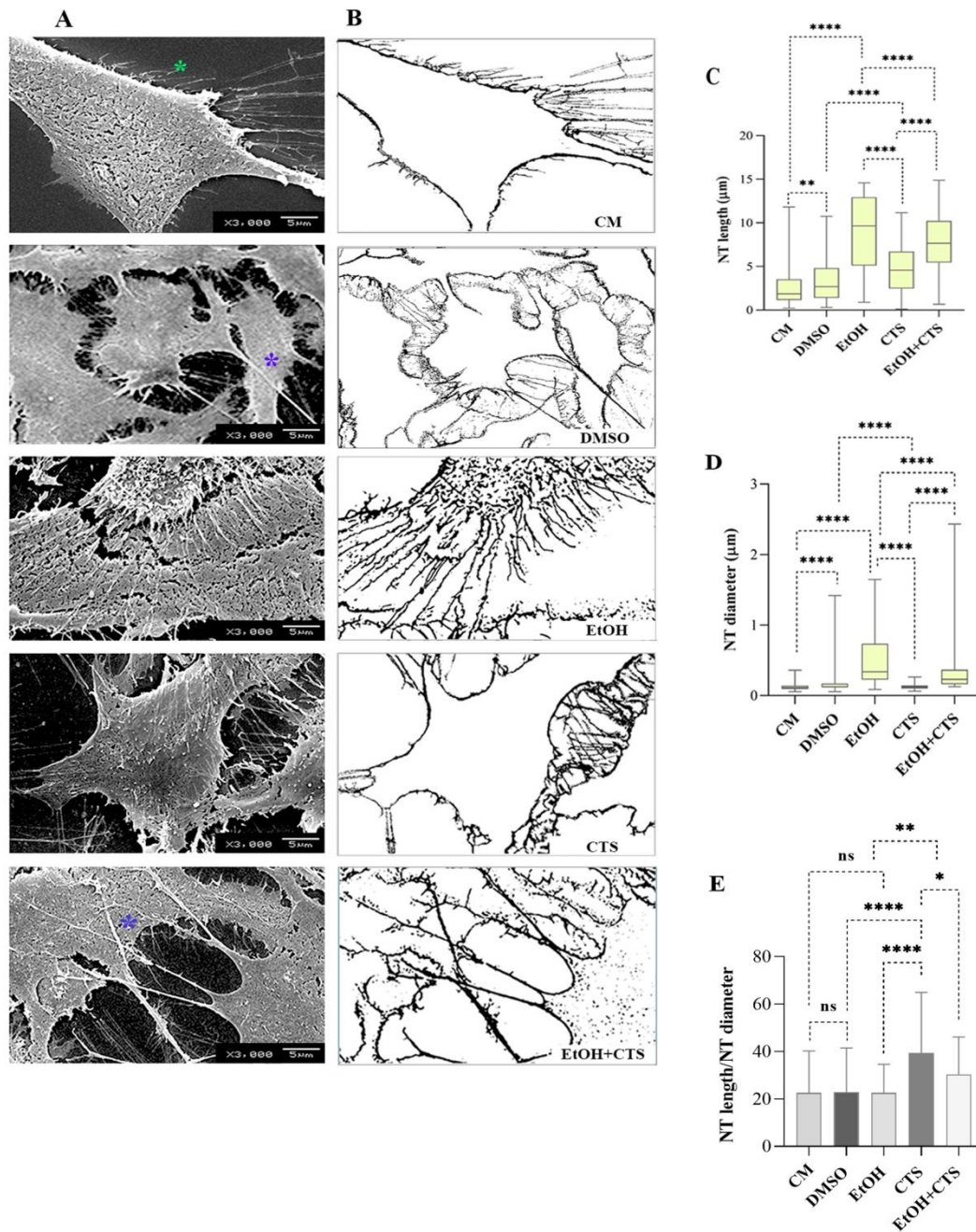


Figura 13.- Aspecto, diámetro y longitud de nanotubos (NTs) en controles y astrocitos expuestos a EtOH y/o CTS. **(A, B)** Imágenes panorámicas obtenidas con MEB (A) y respectivas máscaras binarias esqueletizadas

(B) que ilustran las características de los NTs de astrocitos en las diferentes condiciones experimentales. **(C, D)** Los diagramas de caja representan la distribución de la longitud **(C)** y el diámetro **(D)** de NTs en cada grupo experimental. **(E)** Distribución de la relación entre longitud y diámetro del NTs en cada condición, utilizando medianas e intervalos de confianza del 95%. En todos los casos se analizaron las diferencias entre grupos experimentales mediante la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de la prueba de Dunn entre 25 astrocitos por condición (**** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ y ns: a $p > 0.05$), no significativo. MEB: microscopía electrónica de barrido CM: medios de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS, NTs: nanotubos, VEs: vesículas extracelulares, MEB: microscopía electrónica de barrido.

Vesículas extracelulares

Sobre los somas de astrocitos se identificaron numerosas estructuras de tamaños y formas variables derivadas de las membranas de los astrocitos con las características de VEs. En todos los grupos experimentales, las VEs aparecían tanto adheridas a los márgenes celulares como a las superficies de los astrocitos en todos los grupos experimentales (Figura 14A). Se observó un drástico incremento en la frecuencia de VEs por astrocito en las condiciones de tratamiento respecto a los controles ($p < 0.0001$ en cada caso), no observándose diferencias entre los grupos tratados ($p > 0.05$) (Figura 14B).

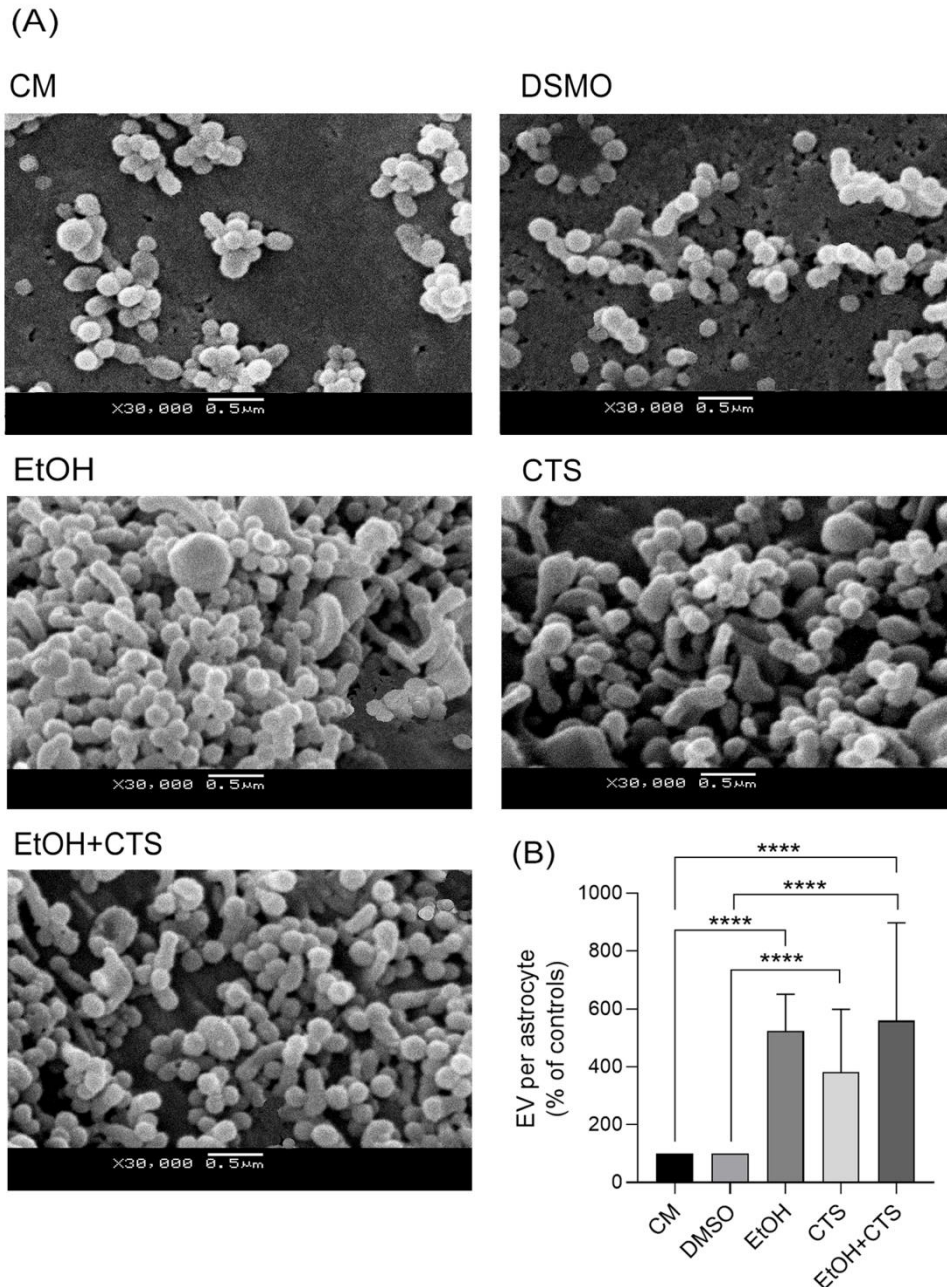


Figura 14.- Vesículas Extracelulares (VEs) adheridas a las membranas celulares de controles y astrocitos expuestos a EtOH y/o CTS. **(A)** Imágenes representativas obtenidas con MEB, que muestran VEs adheridas a la superficie de los somas de astrocitos de las diferentes condiciones experimentales. **(B)** Frecuencias de VEs expresadas como porcentaje de las frecuencias en los controles en cada condición experimental. Se observó una frecuencia significativamente mayor de VE en todas las condiciones tratadas respecto a los controles ($p < 0.0001$ en todos los casos). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de la prueba de Dunn. MEB: microscopía electrónica de barrido, CM: medio de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS. **** $p < 0.0001$.

El análisis de las VEs mediante MEB mostró que estas estructuras presentes sobre los somas astrocitarios poseían diferente morfología, disposiciones y tamaños y cuyas frecuencias variaban según las condiciones experimentales (Figura 15A) De acuerdo a la clasificación VEs establecida por Malenica et al. (2021) con modificaciones menores, identificamos las siguientes formas (Figura 15A-C): (i) VEs redondas (*round*) que compartían una forma esférica común y un tamaño similar (asteriscos rojos); (ii) VE alargadas (*elongated*) menos abundantes, de diferentes longitudes, pero con un claro eje principal (asteriscos azules); (iii) VEs con forma de rosquilla (*donut*) (asteriscos amarillos) en los que ambos extremos se encontraban muy cerca o fusionados y con orificios centrales de diferentes diámetros, algunos muy pequeños que les daban un aspecto más compacto a las rosquillas; (iv) VEs redondas que adoptaban una disposición "similar a una flor" (*rosette - shaped*) con la base fusionada (puntas de flecha amarillas); (v) VEs en forma de palillo de tambor (*drumstick*) que parecían estar formados por una vesícula alargada con una punta redonda agrandada (asteriscos verdes); (vi) VEs en forma de copa (*cup-shaped*) que aparecían como una protrusión redondeada con una depresión central que le daba una apariencia de copa (asteriscos magenta). Curiosamente, un porcentaje menor de VEs mostró morfologías intermedias que no permitían una clasificación clara dentro de un grupo. Al analizar la distribución de la morfología, los controles mostraron VEs con formas predominantemente redondas y alargadas, aunque en el control DMSO también se encontraron algunas VE con forma de roseta. En cambio, en las condiciones de injuria, se observaron todas las morfologías (Figura 15C). La disposición de las VEs también fue variable, la mayoría se presentaban aisladas, pero otras estaban dispuestas ordenadamente en arreglos lineales rectos (Figura 15 D, punta de flecha roja) o en agrupamientos aleatorios (Figura 15D, punta de flecha verde).

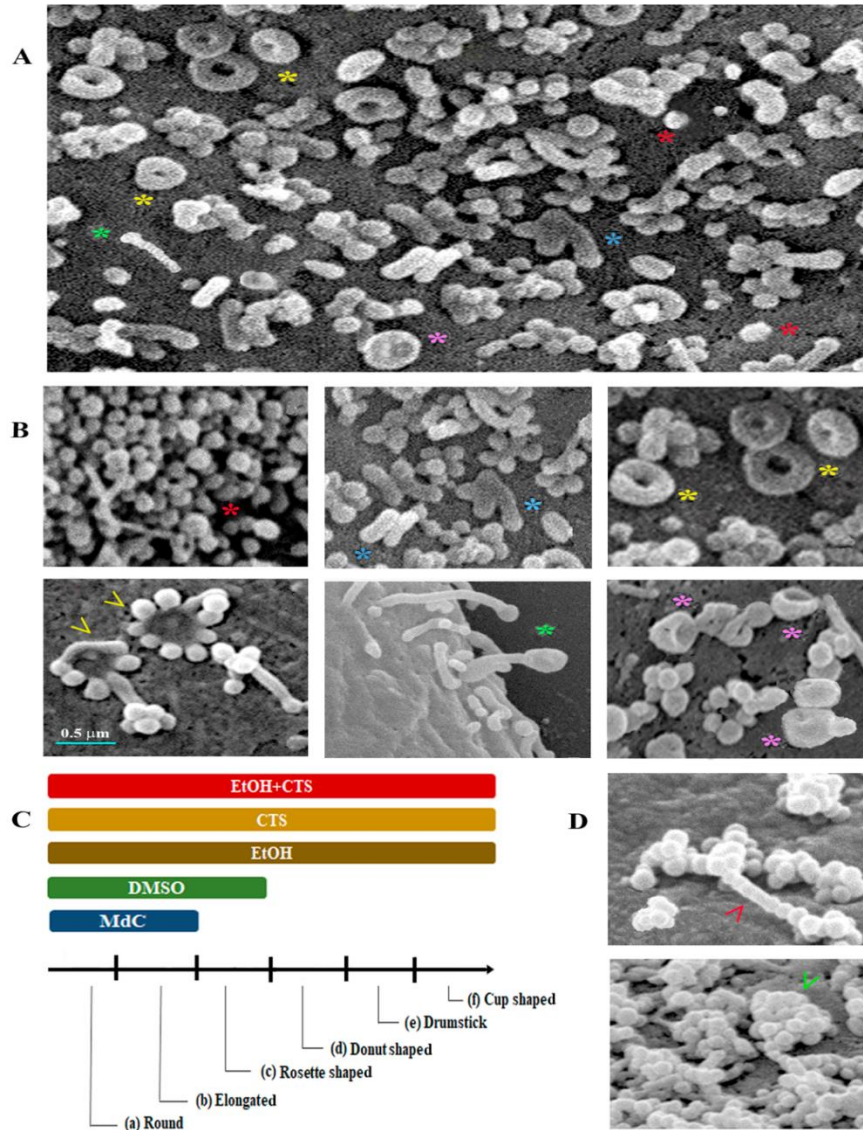


Figura 15.- Características morfológicas de las vesículas extracelulares (VEs) observadas en las superficies de astrocitos sometidos a las condiciones de exposición a EtOH y/o CTS y controles. **(A-B)** Imágenes obtenidas con MEB que ilustran la forma y la disposición de las VEs detectadas en controles o en astrocitos expuestos. Los asteriscos de colores señalan diferentes tipos de VEs (de acuerdo a Malenica et al., 2021) rojo: redondas (*round*); azul: alargadas (*elongated*); amarillo: en forma de rosquilla (*donut*); verde: en forma de palillo de tambor (*drumstick*); rosa: en forma de copa (*cup-shaped*). Las puntas de flecha amarillas, señalan las VEs en forma de roseta (*rosette-shaped*). **(C)** Diagrama que ilustra las diferentes formas de VEs según su distribución comparativa en las diferentes condiciones experimentales (barras de colores). **(D)** Disposiciones de VEs ordenadas linealmente o de forma aleatoria (puntas de flecha roja y verde, respectivamente). MEB: microscopía electrónica de barrido, CM: medios de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS.

Cuando se realizó la cuantificación de las VEs en función de la longitud del eje principal y las características morfológicas en base a Malenica et al. (2021) y Di Daniele et al. (2022), pudimos detectar diferentes subpoblaciones de VEs. La longitud del eje principal de las VEs osciló entre ~ 20 nm y ~ 8 μ m. Más del 90% de las VEs presentó un eje mayor inferior a 500 nm y aproximadamente un 95%, un eje mayor inferior a 1 μ m (compatibles con exómeros, exosomas y ectosomas). Menos de 4% y 1% del total de las VEs presentaron ejes mayores de 1 y 3 μ m, respectivamente (compatibles con migrasomas y cuerpos apoptóticos) y menos del 1% ejes mayores a 5 μ m (VEs gigantes).

La Figura 16 presenta los porcentajes aproximados de estas diferentes subpoblaciones de VEs. Observamos que los pequeños ectosomas fueron la población predominante en todas las condiciones experimentales, seguida de las VEs compatibles con exosomas grandes. Los ectosomas pequeños y los exosomas grandes presentaron mayor frecuencia en las condiciones tratadas que en los controles, especialmente respecto al control MC. Ambos controles mostraron frecuencias más altas de VEs compatibles con exosomas y exómeros pequeños que en las condiciones tratadas, prevaleciendo los exosomas pequeños en el control MC. Los ectosomas grandes, los migrasomas y los cuerpos apoptóticos, presentaron frecuencias muy bajas en todos los grupos experimentales. Sorprendentemente, los VEs >1 μ m y las denominadas VEs gigantes se observaron exclusivamente en astrocitos con daño en el ADN.

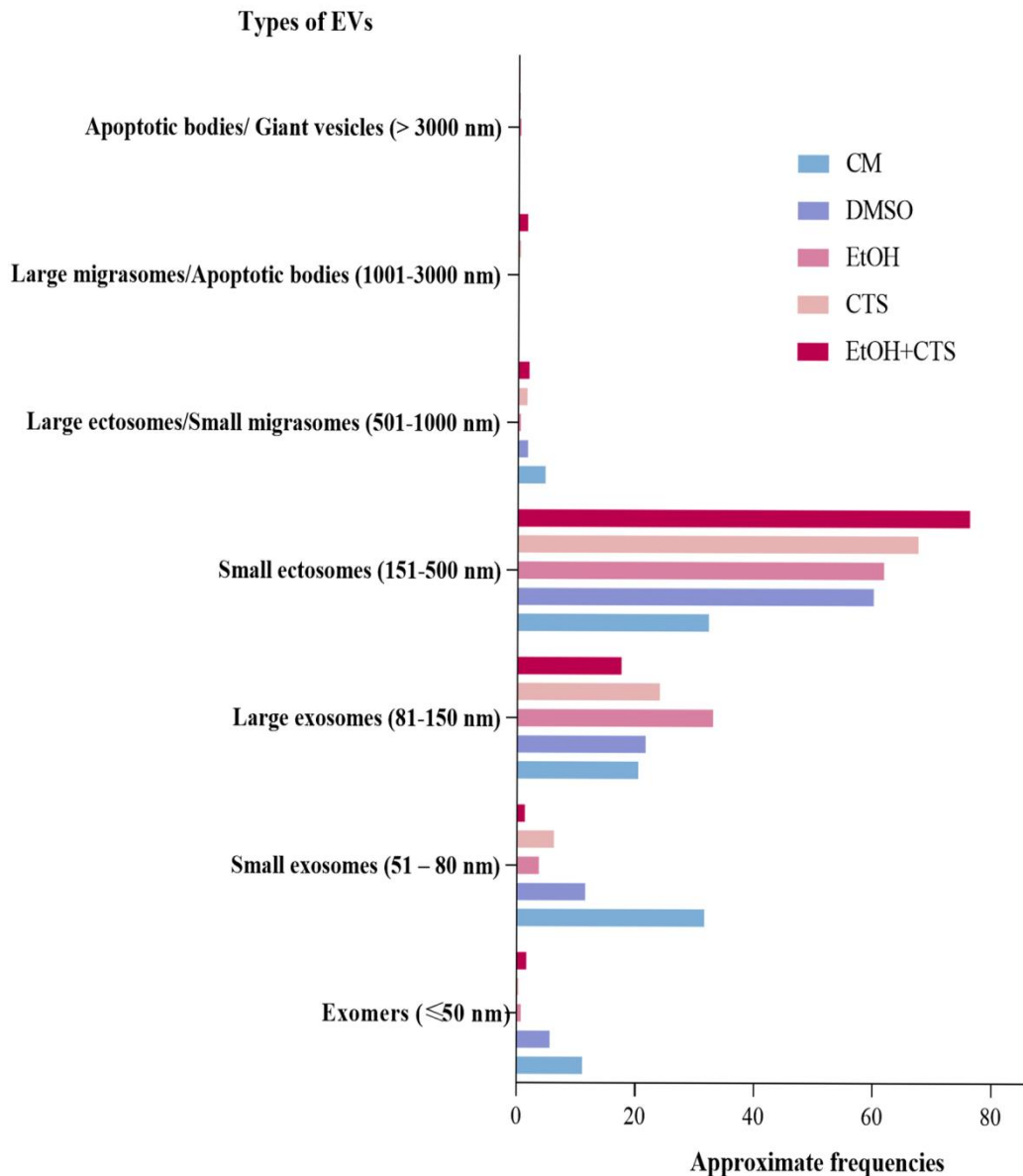


Figura 16.- Frecuencias de las distintas morfologías de vesículas extracelulares (VEs) según las diferentes condiciones experimentales. Las barras representan los porcentajes aproximados de las longitudes del eje principal de las VEs observadas en las superficies astrocitarias. La clasificación de las VEs se realizó de acuerdo a Malenica et al. (2021) y Di Daniele et al. (2022), con mínimas modificaciones. CM: medios de cultivo; DMSO: dimetilsulfóxido; EtOH: etanol; CTS: corticosterona; EtOH+CTS: contratamiento con EtOH y CTS.

Además, las VEs gigantes mostraron características particulares (Figura 17). Estas formaciones complejas exhibieron diferentes grados de compactación y una heterogeneidad considerable, con superficies externas lisas o intrincadas (Figura 17A, B). Las VEs gigantes sólo se presentaron en astrocitos tratados. Tanto su número como las longitudes de sus ejes principales

fueron mayores en los astrocitos expuestos a EtOH y EtOH+CTS que a CTS, predominando en la condición EtOH+CTS (Figura 17C y D, respectivamente).

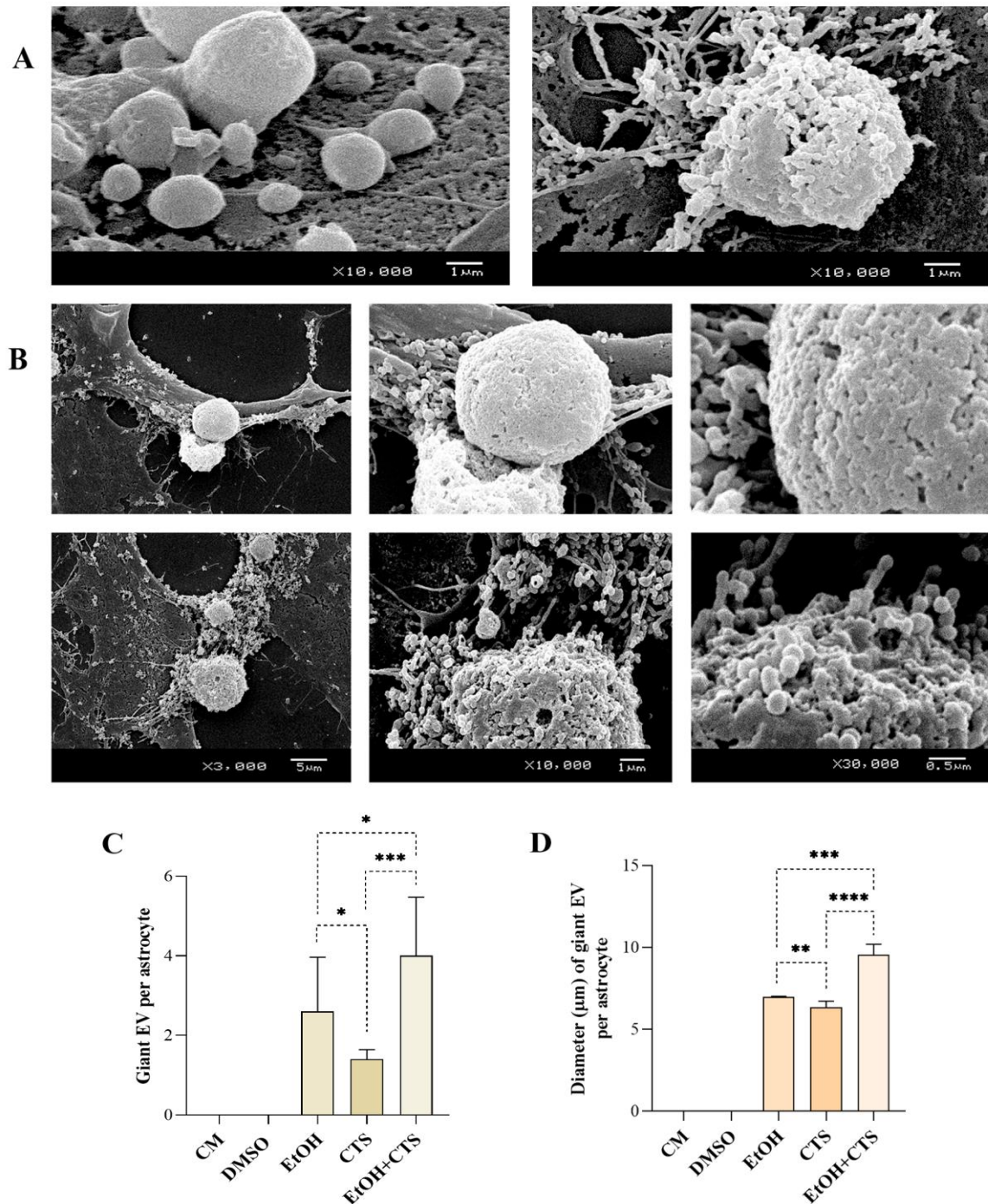


Figura 17.- Vesículas extracelulares gigantes (VEs gigantes) detectados en las superficies de los astrocitos. **(A)** Imágenes obtenidas con MEB de las condiciones de EtOH y/o CTS que muestran VEs gigantes con distintos diámetros y apariencias que varían desde superficies lisas (imagen de la izquierda) hasta morfologías heterogéneas e intrincadas (imagen de la derecha). **(B)** Imágenes de MEB obtenidas a tres aumentos diferentes que muestran VEs gigantes con diferentes grados de compactación y complejidad superficial, incluso, con pequeñas vesículas extracelulares adheridas a la formación principal **(C-D)**

Distribución del número y diámetro de VEs gigantes por condición experimental en base a medianas e intervalo de confianza del 95%. Estas formaciones se observaron sólo en astrocitos expuestos a EtOH y/o CTS (****: $p < 0.0001$; * *: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de la prueba de Dunn. MC: medios de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS, NTs: nanotubos, VEs: vesículas extracelulares, MEB: microscopía electrónica de barrido.

Vesículas extracelulares en Nanotubos

Las imágenes de MEB revelaron una cantidad significativa de VEs de formas redondeadas que estaban asociadas a los NTs (Figuras 18A-C). Muchas VEs parecían transferirse entre diferentes células a través de NTs (Figura 18A-C). Algunas de ellas estaban dispuestas desordenadamente sobre la superficie de los NTs, probablemente usando la superficie como andamio para trasladarse (Figuras 18A-C; letras a). Otras, parecían estar dentro de los NTs (Figura 18A; letras b), y probablemente, viajaban a través del lumen de los NTs.

Algunos NTs muy largos, presentaron longitudes que eran el doble o el triple en comparación con las formaciones más típicas (Figura 18C). Estos NTs presentaban VEs en sus superficies (Figura 18C: letras a) y tomaban contacto con astrocitos distantes (Figura 18C). La distribución de la frecuencia de VEs en NTs fue más elevada respecto a los controles. Aumentó de manera similar en los astrocitos tratados con EtOH o CTS, pero se observó un predominio de VEs en NTs de los astrocitos coexpuestos en comparación con el resto de los grupos experimentales (Figura 18D).

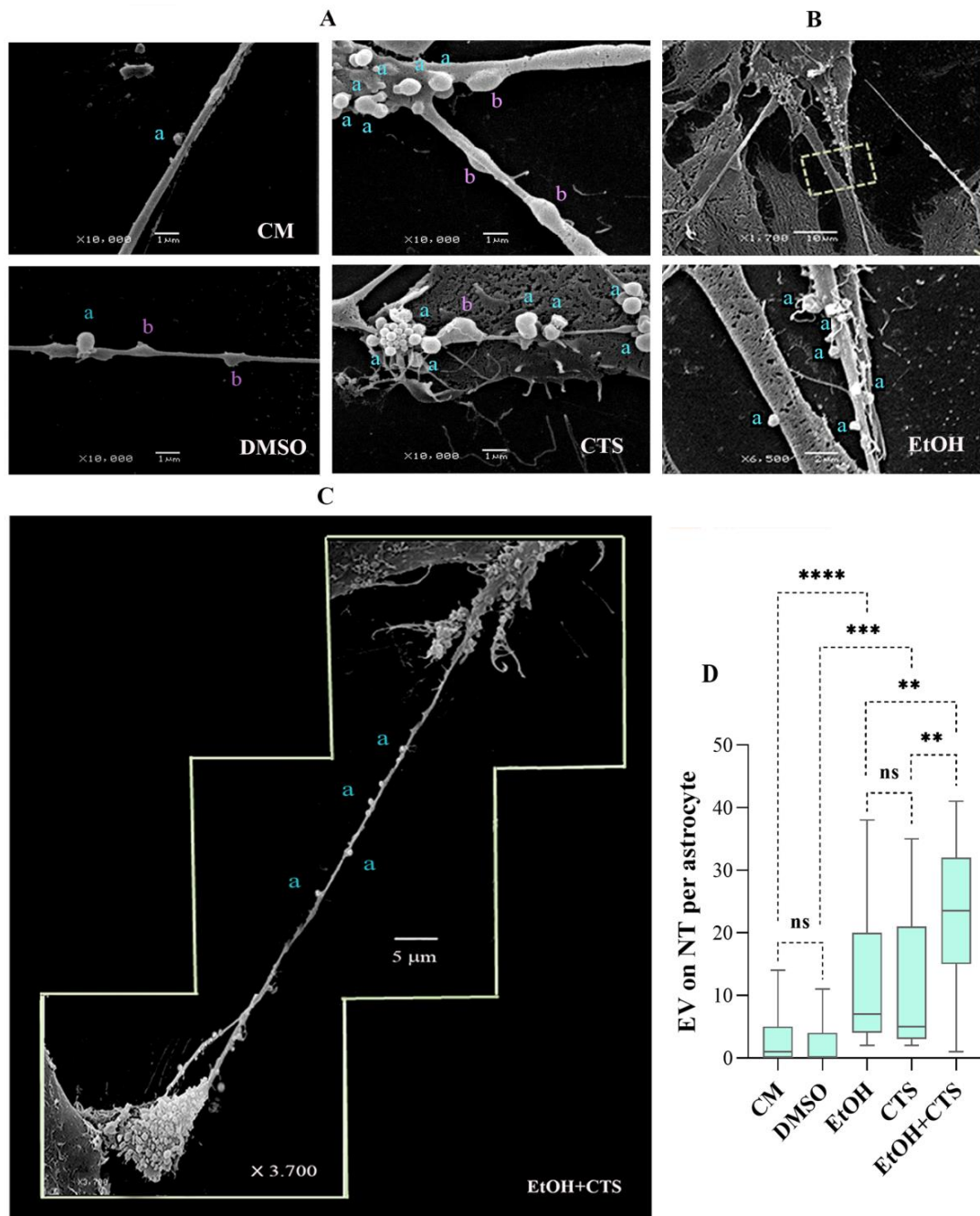


Figura 18.- VEs observadas en la superficie de NTs de controles y astrocitos expuestos. **(A)** Imágenes obtenidas con MEB que muestran VEs ubicadas en las superficies de los NTs (indicadas con letras “a”) o dentro de los mismos (señaladas con letras “b”). **(B)** Imágenes de MEB de un astrocitos tratado con EtOH que muestra, a dos magnificaciones diferentes, la presencia de VEs sobre la superficie de sus NTs **(C)** Composición de tres imágenes de MEB para mostrar un NT largo, con VEs en su superficie, que conecta dos astrocitos distantes. **(D)** El diagrama de caja representa la distribución del número de VEs en los NTs de astrocitos de cada condición experimental. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de la prueba de Dunn (****, *** y **: $p < 0.0001$, 0.001 y 0.01 , respectivamente, ns: $p > 0.05$, no significativo) en 50 astrocitos por condición. MEB: microscopía

electrónica de barrido, CM: medios de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS, NTs: nanotubos, VEs: vesículas extracelulares.

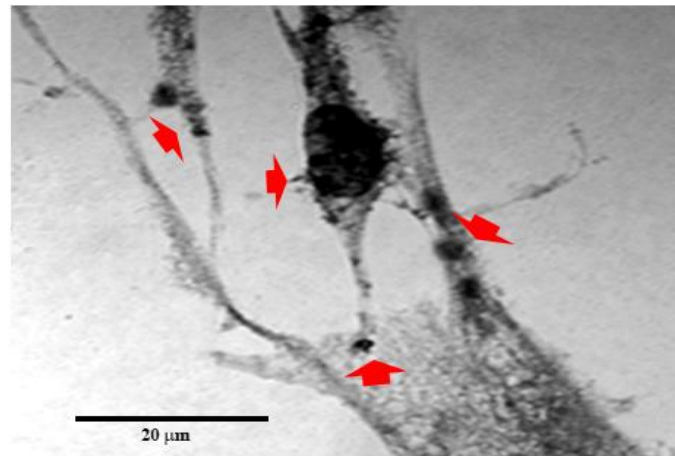


Figura 19.- Vesículas extracelulares (VEs) con ácidos nucleicos en su interior. Imagen coloreada con azul de toluidina y visualizada mediante microscopía confocal + DIC que muestra VEs con cargas de ácidos nucleicos (flechas rojas).

Si bien no analizamos la composición detallada de las VEs, realizamos una exploración preliminar empleando azul de toluidina que permitió detectar VEs con contenido de ácidos nucleicos (Figura 19, flechas rojas).

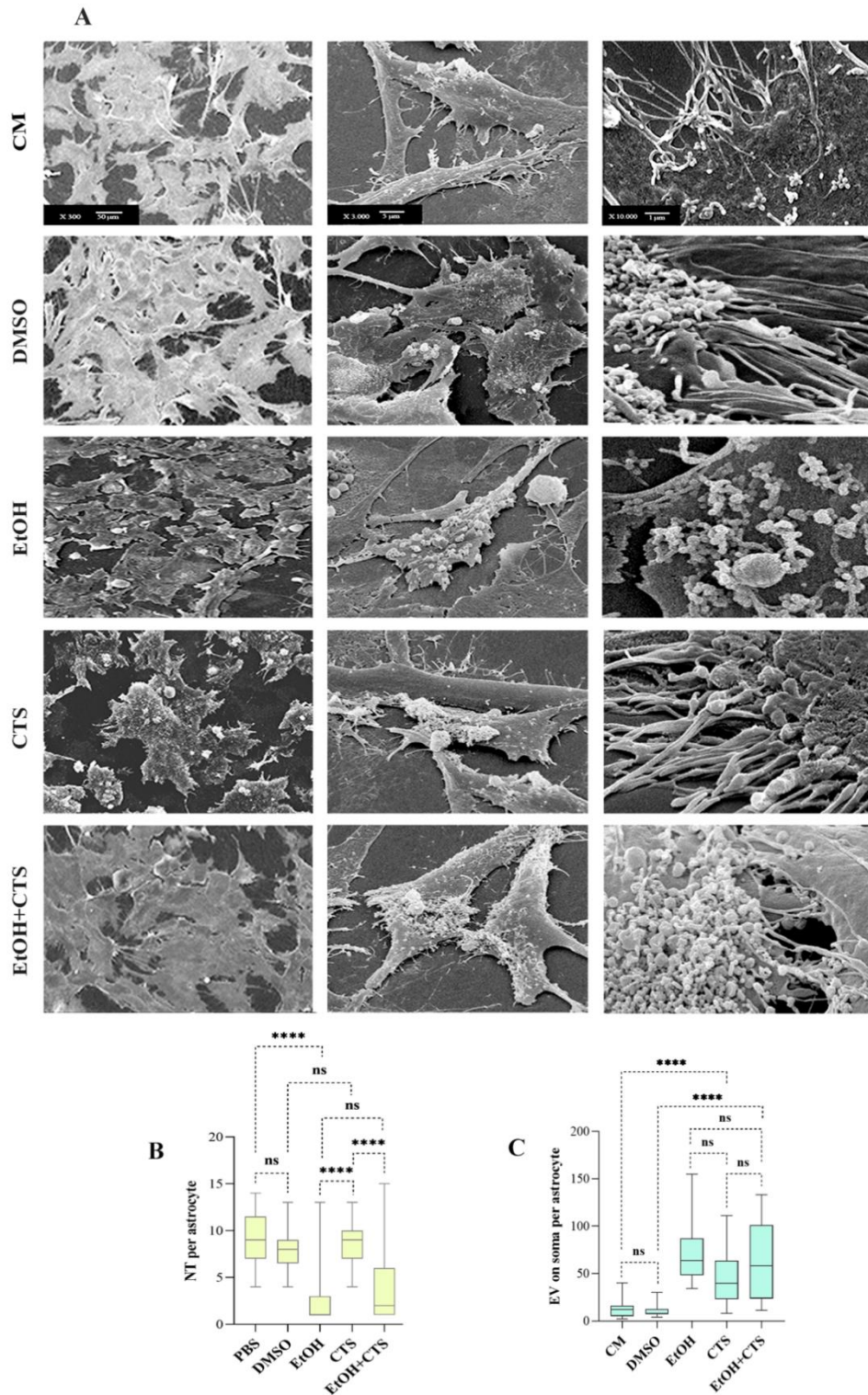


Figura 20.- NTs y VEs de astrocitos según exposiciones a EtOH y/o CTS. **(A)** Imágenes de MEB con tres aumentos crecientes que muestran NTs y VEs en la superficie de los astrocitos de las condiciones control (MC, DMSO) o tratadas (EtOH, CTS, EtOH+CTS). **(B-C).** Diagramas de caja que representan la distribución del número de NTs o VEs por astrocyto en cada condición experimental. Las diferencias entre 50 astrocytos por variable y grupo experimental se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones

múltiples de la prueba de Dunn (**** y **: $p < 0.0001$ y 0.01 , respectivamente. ns: $p > 0.05$. MEB: microscopía electrónica de barrido, MC: medios de cultivo, DMSO: dimetilsulfóxido, EtOH: etanol, CTS: corticosterona, EtOH+CTS: cotratamiento con EtOH y CTS, NT: nanotubos, VE: vesículas extracelulares.

DISCUSIÓN

Este trabajo fue diseñado para identificar si los astrocitos del hipocampo podrían sufrir daño inmediato y de relevancia en su ADN después de 1 h de incubación con diferentes concentraciones de EtOH y/o CTS. Las curvas de dosis-respuesta realizadas con el biomarcador de daño de ADN, foci de γ H2AX, muestran claramente que respecto a sus controles, el ADN de los astrocitos sufrió daños significativos al ser expuestos a 400 mmol/L de EtOH y 1 μ mol/L de CTS. Curiosamente, estas concentraciones no desencadenaron un cambio morfológico compatible con la reactividad inmediata de los astrocitos, lo que sugiere que la inducción de daño al genoma puede ser un evento temprano, que participa en la cascada de daño del SNC, como lo informó Kok et al. (2021). Por lo tanto, el primer punto fuerte de este trabajo fue la capacidad de detectar daño significativo en el ADN y la respuesta celular inmediata ante solo 1 h de exposición.

Paradigma experimental, fortalezas, debilidades y hallazgos

Las altas concentraciones de EtOH utilizadas introducen algunos inconvenientes que decidimos aceptar para obtener un daño inmediato y cuantificable en el ADN y poder analizar los primeros eventos de la respuesta DDR. El rango de concentraciones evaluado se basó en artículos preliminares que mostraban respuestas muy rápidas de los astrocitos ante altas concentraciones de EtOH (hasta 300 mmol/L, Haghighat et al. 1999; Adermark et al., 2004) y respuestas lentas (Wu et al., 2010; Goeke et al., 2018) a concentraciones más bajas de mmol/L, incluso en incubaciones en el rango de milimol/L que duraban muchos días (Guerri et al., 1990, Yang et al., 2010; Sarc et al., 2011). Los estudios de dosis-respuesta indicaron que, durante el tiempo de incubación elegido de 1h, no había mucho margen para disminuir las concentraciones de trabajo de EtOH y obtener la inducción de daño, por lo cual elegimos la menor concentración de EtOH que permitiera cumplir nuestros objetivos. Sin embargo, es posible considerar la realización de experimentos más largos (3 a 6 h) para evaluar si se puede provocar daño en el ADN con concentraciones más cercanas a las utilizadas por los consumidores problemáticos de alcohol. Aunque esta posibilidad tiene una ventaja traslacional, el daño primario del ADN y los primeros eventos de DDR no podrían identificarse claramente.

En cuanto a la concentración de trabajo de CTS, el valor fue mayor que la concentración basal de CTS en sangre de ratón (van der Mierden et al., 2020), pero menor que el presente en ratas estresadas (Bekhat et al., 2018) y menor que la concentración empleada por Flint et al. (2007) y Chatterjee y Sikdar (2013) y, además, siendo mucho menor a los 12.5 – 200 μ mol/L empleados durante 2 minutos en cultivos astrocitarios por Xia et al. (2018). También fue

reportado el tratamiento de astrocitos en cultivo con CTS 0.01 a 10 $\mu\text{mol/L}$ durante 24 h (Hisaoka-Nakashima et al., 2020). Es de destacar, que la moderada concentración de CTS empleada en el presente trabajo fue suficiente para detectar el daño inducido y la respuesta inmediata al daño. Otro aspecto a mencionar es que se podría enriquecer este trabajo usando otros biomarcadores de daño en el ADN, diferentes a los focos de γH2AX , o detectando el daño con otros métodos, como el ensayo cometa que permite determinar el porcentaje de ADN dañado en función de la longitud de la cola del cometa (Swain & Subba, 2011), el cometa-fish utilizando sondas de ADN conjugadas a un análogo de base modificado o la electroforesis de campo pulsado en dos fases, para identificar SSB y DSB. De todos modos, estos métodos, así como el Western blot, serían complementarios ya que no han resultado más fieles que la γH2AX en la detección del daño genético primario. El ensayo cometa, permite la detección de DSB (Collins et al., 1997) con una sensibilidad aproximadamente 1000 veces menor que el inmunanálisis microscópico y 100 veces menor que la detección de γH2AX por citometría de flujo. Ninguno de los dos métodos alternativos permite estudiar el daño en el contexto de la cromatina (Ismail et al. 2007). Comparando diferentes métodos, Reddig et al. (2018) concluyeron que la cuantificación microscópica de focos de γH2AX es la técnica más sensible para la determinación de γH2AX debido a su sensibilidad, permitiendo detectar un solo foco en la cromatina. En este contexto, la inmunodetección γH2AX se ha propuesto en biodosimetría para evaluar el daño al ADN inducido por radiaciones menores a 1 mGy (Redon et al., 2009; Rothkamm & Horn, 2009; Jucha et al., 2010; Schmid et al., 2012; Akuwudike et al., 2023) y para detectar o monitorear la sensibilidad a la radiación o la quimioterapia (Taneja et al., 2004; Dickey et al., 2009; Goodarzi y Jegg, 2012; Ivashkevich et al., 2012). Además, nuestro grupo cuenta con amplia experiencia en la aplicación del ensayo de inmunomarcaje γH2AX combinado con microscopía confocal o de alta resolución (Lafon-Hughes et al., 2013; Liddle et al., 2014, 2020; Di Tomaso et al., 2014; 2018). Otras técnicas como la inmunotransferencia solo permite la cuantificación del nivel total de proteína γH2AX sin diferenciar entre células viables (focos) o apoptóticas (señal panuclear) (Rogakou et al. 1999; Ding et al., 2016). Por último, la detección de roturas de cadenas de ADN mediante un enfoque genómico implica tecnologías de secuenciación y análisis bioinformáticos a nivel de todo el genoma (Frock et al., 2015). Sin embargo, estos enfoques son costosos y requieren validación mediante otras metodologías, que incluyen las técnicas de inmunomicroscopía.

Tras la incubación con EtOH y/o CTS, los resultados obtenidos indican la inducción de (a) un daño significativo en el ADN según lo evaluado mediante la detección de la fosforilación de H2AX; (b) la detención del ciclo celular, sugerida por la disminución de la señal de Ciclina D1 y (c) la activación de BER, indicada por un aumento de la señal de APE1. En la mayoría de los casos, la

co-exposición a EtOH+CTS no produjo resultados distintos a los obtenidos con EtOH o CTS solos. Estos resultados inesperados, son contrarios al bucle de refuerzo positivo entre los niveles de EtOH y CTS que la literatura sugiere desde hace tiempo (Rivier et al., 1984). En cambio, pueden implicar que la duración del diseño experimental fue demasiado corta para observar los efectos aditivos entre ambos compuestos o que cada uno opera en diferentes etapas del mismo mecanismo subyacente. Cabe destacar que la señal nuclear exclusiva de γ H2AX descarta la posibilidad de inducción de daños significativos en el ADN mitocondrial, como lo demuestra la ausencia de señal citoplasmática en todas las condiciones experimentales (Figura 6). Además, los resultados obtenidos mediante la evaluación de la inmunorreactividad de S100 β , el número de nucléolos y la frecuencia de VEs unidas a las membranas de astrocitos evidencian claramente una respuesta celular casi inmediata al EtOH y/o CTS. Sin embargo, los datos de GFAP y faloidina, obtenidos con las concentraciones de EtOH y CTS empleadas, indican claramente la ausencia de cambios significativos en la morfología celular concordantes con la reactividad astrocitaria típica.

Daño inducido en el ADN tras exposiciones breves a EtOH y/o CTS

La fosforilación de H2AX es un biomarcador de daño en el ADN que representa uno de los primeros eventos de la DDR y su inmunorreactividad nuclear es paralela a las lesiones del ADN (Amente et al., 2019). Como mencionamos anteriormente, el daño al ADN genómico se evaluó mediante foci de γ H2AX, los que se producen unos minutos después de su inducción por la fosforilación de la variante de histona H2A, H2AX (Rogakou et al., 1998, 1999; Kinner et al., 2008; Liddle et al., 2014; Di Tomaso et al., 2014; Reyes-Ábalos et al., 2018). Los foci de γ H2AX señalizan roturas de doble hebra (Rogakou et al., 1998, 1999) y también roturas de hebra simple causadas por el bloqueo de la horquilla de replicación o por intermediarios de ADN de hebra simple de los sistemas de reparación (Martí et al., 2006; Matsumoto et al., 2007). Dado que las roturas de doble cadena implican una interrupción de la continuidad del ADN, representan el tipo más grave de lesiones (Natarajan y Obe, 1984). γ H2AX se expresa en todas las afecciones neurodegenerativas prototípicas (Merighi et al., 2021). Se observó su aumento significativo en las regiones cerebrales como el hipocampo y la neocorteza, de muestras de autopsias de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Myung et al., 2008). Menos conocidos son los niveles de γ H2AX en células gliales ya sea en condiciones fisiológicas o patológicas y no se encontraron informes previos sobre este parámetro en exposiciones agudas a EtOH o CTS. Los resultados obtenidos muestran que una única exposición a concentración alta de EtOH con/sin CTS (Flint et al., 2007; Flaherty et al., 2017) provocó un daño significativo en el ADN después de 1 h de incubación, según lo detectado por

inmunorreactividad de γ H2AX nuclear selectiva y significativa con respecto a los controles (Figuras 3, 4 y tabla 3).

Se ha descrito que la intoxicación por EtOH provoca estrés oxidativo, mediadores proinflamatorios y producción de citoquinas que contribuyen al daño neuronal (Adermark y Bowers, 2016). Además, la exposición a hormonas del estrés como CTS también facilita la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Montoliu et al., 1995; Russo et al., 2001, Madrigal et al., 2001; Duclos et al., 2004; Du et al., 2009), que pueden originar múltiples productos de ADN oxidado como bases nitrogenadas oxidadas y hebras rotas (Cooke et al., 2003). A su vez, los astrocitos corticales tratados con EtOH activan el inflamósoma, facilitando la generación de ROS (Alfonso-Loeches et al., 2014). Por lo tanto, un desequilibrio significativo entre la producción y eliminación de ROS, tras la exposición a EtOH o CTS, podría desafiar no sólo las funciones neuroprotectoras de los astrocitos (Zhu et al., 2006), sino también la integridad de su genoma, la propia proliferación y supervivencia lo cual fue demostrado previamente en los astrocitos del hipocampo (Lamarche et al., 2004; Pretorius & Marx, 2004; Yu et al., 2011; Joshi & Benerjee, 2018). El daño del ADN mediado por ROS podría contribuir a las acciones nocivas de los astrocitos, ya sea para ellos mismos o para otras células neurales.

El daño al ADN puede ser la base de algunas afecciones neurológicas, incluidas las relacionadas con la edad, las alteraciones genéticas heredadas o los hábitos (Kok et al., 2021). Informes anteriores mostraron que la exposición del mesencéfalo de ratón durante 24 h a EtOH generó roturas de cadenas de ADN en neuronas y glía (Rulten et al., 2008). Respecto a los astrocitos, estas células se acumularon en G0 - G1 (Guerri et al., 1990), sufrieron fragmentación del ADN, muerte necrótica (Holownia et al., 1997), aumento de marcadores proinflamatorios (Vallés et al., 2004) o disminución de la actividad mitocondrial (Gonthier et al., 2012) tras la incubación con EtOH en tiempos que oscilaban entre 48 h y una semana y en concentraciones de 20 a 100 mM, respectivamente. Por lo tanto, la evidencia indica que el EtOH indujo daño en el ADN en concentraciones mucho más bajas que las utilizadas en este trabajo, pero requirió incubaciones mucho más largas. Por el contrario, existen antecedentes que indican que, en concordancia con nuestros resultados obtenidos en cultivos de astrocitos, CTS, al igual que otras hormonas del estrés, pueden provocar daño en el ADN de células murinas cultivadas tras exposiciones de tan sólo 10 minutos y no requiriendo concentraciones en los niveles del EtOH para desencadenar inmunorreactividad a γ H2AX significativa y comparable (Flint et al., 2007; Flaherty et al., 2017). Este hallazgo permite dimensionar la influencia del estrés sobre la integridad del genoma.

Activación de la DDR tras la incubación con EtOH y/o CTS

Los antecedentes sugieren que γ H2AX actúa no sólo como marcador de daño en el ADN, sino también como participante en funciones dependientes de la DDR, como la regulación de puntos de control del ciclo celular, la estabilidad genómica, el crecimiento celular, la mitosis y la apoptosis (Merighi et al., 2021). Nuestros resultados evidencian que el significativo daño inducido en el ADN por EtOH y/o CTS en los astrocitos promovió la inmunorreactividad de γ H2AX y que la γ H2AX indujo la activación temprana de las vías celulares que participan en la DDR (Nyberg et al., 2002; Laiho & Latonen., 2003; Niida y Nakanishi 2006; Bartek et al., 2007; Reyes-Ábalos et al., 2024). Entre ellas, las vías de control del ciclo celular de reparación del ADN y la muerte celular (evaluadas mediante la inmunoreactividad de Ciclina D1, APE1 y BAX, respectivamente) (Reyes-Ábalos et al., 2024).

Este hallazgo sugiere en el paradigma experimental empleado, que la progresión de la cascada DDR (Musgrove, 2006) y la activación de la reparación del ADN (Krokan & Bjørås, 2013) y la apoptosis también podrían tener lugar en los astrocitos dañados.

La Ciclina D1 es una proteína multifuncional que tiene un papel importante en la progresión del ciclo celular al promover el avance a través de G0 a G1 (Figura 3), actuando como un sensor mitogénico e integrando las señales mitogénicas extracelulares con la progresión del ciclo celular (Fu et al., 2004; Tchakarska & Sola., 2020), por lo cual su disminución reduce las posibilidades de progresión del ciclo celular. Entre otras funciones, la Ciclina D1 también interactúa con factores de remodelación de la cromatina (p300/CBP, P/CAF) y enzimas (HAT y HDAC) para modificar la estructura de la cromatina, o con los coactivadores del receptor de esteroides (SRC1 y SRC3) para aumentar la actividad transcripcional del estrógeno (McMahon et al., 1999).

En este sentido, el coeficiente M1 de Manders cercano a 1, obtenido en todas las condiciones de tratamiento, sugiere que toda el área positiva de γ H2AX colocaliza con la Ciclina D1 (Figura 5). Dicha colocalización podría estar asociada a la DDR porque γ H2AX reclutaría a la Ciclina D1 en los sitios dañados (Rogakou et al., 1998; Fernandez-Capetillo 2003; Kinner et al., 2008) a través de una cascada de reacciones que van desde las proteínas sensoras de daño al ADN hasta las proteínas efectoras (Figura 1). Esta posibilidad de colocalización requiere ser confirmada mediante FRET o ensayos de coinmunoprecipitación (Tan y Yammami, 2022). Por otro lado, como muestra el coeficiente M2 de Manders, las señales nucleares de la Ciclina D1 no se restringieron

a las áreas dañadas del ADN, se propagaron por todo el núcleo, incluso en los controles (Figura 5). Esto indicaría que la Ciclina D1 podría estar desempeñando otras funciones nucleares, aparte de las canónicas (Fu et al., 2004; Tchakarska & Sola., 2020).

En el contexto de nuestros experimentos, EtOH no afectó la inmunorreactividad de la Ciclina D1 nuclear de manera significativa, lo que sugiere que los efectos no son importantes sobre el ciclo celular de los astrocitos o su tasa de proliferación. Esta es una diferencia con informes anteriores que han mostrado efectos inhibidores del EtOH en la síntesis, transcripción y replicación de ADN en células en proliferación (Rulten et al., 2008) y en neuroblastos corticales cerebrales tras 8 - 12 h de incubación con EtOH (Riar et al., 2016). Aunque inicialmente podemos especular que esta ausencia de efectos podría ocurrir, en parte, porque el EtOH necesita más de 1 h para modificar la proliferación de astrocitos en el nivel de reposo alcanzado tras 24 h de SFB al 2%. Por el contrario, la disminución de la Ciclina D1 nuclear tras el tratamiento con CTS es consistente con la detención del ciclo celular. En este sentido, Sundberg et al. (2006) demostraron que la exposición a CTS disminuye la proliferación de las células madre neurales embrionarias, probablemente en forma relacionada con la degradación dependiente de la ubiquitinación de la Ciclina D1. También se ha observado que CTS podría inducir un aumento de P27, que inhibe CDK4 y cuya inhibición, a su vez, se asocia a disminuciones del complejo CDK/Ciclina D1 nuclear, contribuyendo así a la detención del ciclo y a la reducción de la proliferación celular (Jiang et al., 2002; Jirawatnotai et al., 2012).

También encontramos inmunorreactividad citoplasmática significativa de la Ciclina D1 en todas las condiciones experimentales, con valores disminuidos en relación a los controles en CTS, pero muy aumentados en EtOH (Figura 6C). Se ha reportado previamente en astrocitos la presencia de Ciclina D1 citoplasmática, la que probablemente desempeña funciones en la adhesión célula-matriz (Ciapa y Granon, 2018), la regulación de la senescencia, la autofagia (Brown et al., 2012) las funciones mitocondriales (Sakamaki et al., 2006) o la migración celular, lo cual depende de la fosforilación por el complejo Ciclina D1/CDK4/6 de proteínas citoesqueléticas involucradas en la remodelación de la forma celular (Li et al., 2006, Zhong et al., 2010; Bendris et al., 2015).

La Ciclina D1 citoplasmática de los astrocitos podría jugar un papel regulador en los procesos de invasión celular y en las metástasis, en forma similar a lo reportado en fibroblastos (Fusté et al., 2016) o queratinocitos, donde parece regular la adhesión célula-matriz (Fernández-Hernández et al., 2013). La plasticidad adaptativa astrogial discutida por estos autores estaría relacionada con la presencia de Ciclina D1 citoplasmática.

También se sabe que los niveles de Ciclina D1 oscilan a lo largo del ciclo celular entre los compartimentos nuclear y citoplasmático, donde en respuesta a señales mitogénicas, el complejo activo Ciclina D1/CDK4/6 ingresa al núcleo promoviendo la progresión del ciclo celular y luego se exporta al citoplasma para su degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma (Shan et al., 2009). Aunque este tipo de re-compartimentalización a favor del citoplasma podría darse en los astrocitos tratados con EtOH, la disminución de las señales citoplasmáticas y nucleares ante la presencia de CTS podría implicar una reducción significativa de los niveles de Ciclina D1 que podrían afectar la eficacia de la reparación del ADN y la DDR. Sería necesario confirmar posteriormente esta posibilidad empleando Western blot.

APE1 es una proteína importante del mecanismo de reparación de tipo BER (Izumi y Mitra, 1998; Fritz, 2000; Tosolini et al., 2020), con una expresión nuclear predominante, relacionada a sus funciones de endonucleasa y reguladoras de la transcripción (Fritz., 2000). Sin embargo, también se describió la ubicación citoplasmática de APE1, que está regulada dinámicamente (Choi et al., 2016) y relacionada con el manejo del estrés oxidativo (Choi et al., 2016), a través de la inhibición de la producción de ROS (Angkeow et al., 2002) y de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (Baek et al., 2016). APE1 citoplasmática también podría inhibir la inducción de mediadores proinflamatorios y citoquinas quimiotácticas (Joo et al., 2019), incluso en astrocitos, al alterar la expresión y secreción de TNF- α y/o regular negativamente la señalización de NF- κ B (Baek et al., 2016), lo que sugiere propiedades antiinflamatorias relevantes (Askalan et al., 2006; Park et al., 2013; Baek et al., 2016). Nuestros resultados mostraron aumentos de la inmunoreactividad de APE1, tanto en los compartimentos nuclear como citoplasmático de los astrocitos expuestos a EtOH y EtOH+CTS, pero tras la incubación de CTS sólo fueron significativos los incrementos de APE1 en el núcleo (Figura 7). Por lo tanto, en el contexto de nuestros experimentos, el aumento de la inmunorreactividad de APE1 nuclear sugiere que se activó la vía del BER para reparar el daño generado en el ADN por acción de EtOH y/o CTS. Además, en los casos de EtOH y EtOH+CTS, pero no en la exposición a CTS, la inmunorreactividad de APE1 citoplasmática aumentada sugiere una respuesta modesta que podría estar asociada a una respuesta celular antioxidante y antiinflamatoria.

Con respecto a la inmunorreactividad de BAX, la misma aumentó tanto en el citoplasma como en el núcleo de los astrocitos, inmediatamente después de 1 h de exposición a EtOH y/o CTS (Figura 8). En ambos subcompartimentos, la señal de BAX varió de forma paralela a las frecuencias de los foci de γ H2AX. Estos hallazgos sugieren una relación entre el rápido aumento de la señal de BAX y el nivel de daño. Sin embargo, como no se observaron cambios morfológicos

en los astrocitos expuestos, los cambios en la inmunorreactividad de BAX podrían preceder a los posibles efectos apoptóticos detectables, los cuales podrían aparecer a posteriori.

Los cambios en la inmunorreactividad de BAX también indicarían la activación de la DDR, ya que BAX es un efector de la apoptosis dependiente de p53, proteína central del control del ciclo celular (Roos & Kaina, 2006; Elmore, 2007; Yan et al., 2014). Las funciones pro-apoptóticas de BAX son compatibles con su aumento en los subcompartimentos citoplasmáticos y mitocondriales (Borner, 2003; Chipuk y otros, 2004; 2008). Sin embargo, BAX podría viajar desde el citosol al núcleo durante la apoptosis en respuesta a diversos estímulos de estrés. Esto ocurriría junto a la translocación hacia el citoplasma de algunas proteínas nucleares como p53, donde podrían cumplir roles apoptóticos o incluso, otras funciones (Lindenboim et al., 2011; 2013) no bien conocidas a la fecha (Mandal et al., 1998; Lindenboim et al., 2020).

Asimismo, observamos que BAX ocupa territorios nucleares eucromáticos y tiende a excluir regiones de heterocromatina silente lo que sugiere que cumple funciones nucleares. En este aspecto, Brayer et al. (2017) demostraron que, en células no apoptóticas, BAX se asociaba a la cromatina participando en la modulación del ciclo celular y la proliferación mediante la modulación de CDKN1A (inhibidor de la quinasa dependiente de Ciclina 1A), que media el ciclo celular dependiente de p53. Otras funciones atribuidas a BAX nuclear incluyen la modulación de la diferenciación basal y la migración (Brayer et al., 2017), que son aspectos críticos durante la tumorigénesis y el daño del SNC. Otra función no canónica de BAX es la asociación con el estrés oxidativo (Lidenboin et al., 2013). Serán necesarios más estudios para conocer si BAX colocaliza con mitocondrias y comprender si su translocación mitocondrial ocurrió en nuestro paradigma experimental y asimismo para desentrañar si la inmunorreactividad temprana de BAX precede a la muerte celular apoptótica o está relacionada con funciones no pro-apoptóticas de BAX. En suma, pese al incremento de BAX (Figura 8), la ausencia de modificaciones en la forma nuclear o en la compactación de la cromatina en los astrocitos tratados con EtOH y/o CTS, descarta eventos apoptóticos tardíos significativos, probablemente debido a la corta exposición de 1 h.

Análisis del estado de activación de los astrocitos tras la incubación con EtOH y/o CTS

En este trabajo de tesis, también evaluamos si la exposición a concentraciones altas de EtOH o a CTS provocaba cambios en la inmunorreactividad de los marcadores astrocitarios típicos, GFAP y S100 β (Díaz-Amarilla et al., 2011; Escartin et al., 2021). GFAP es una proteína de los filamentos intermedios, cuya agregación está asociada con la reactividad típica de los astrocitos, la que morfológicamente se observa como reducción del cuerpo celular y emisión de procesos

celulares importantes. Los resultados obtenidos en las concentraciones de trabajo empleadas indican que los astrocitos no mostraron cambios celulares significativos que pudieran significar una reactividad morfológica típica. De acuerdo con lo expuesto, sólo se encontraron aumentos leves en la inmunorreactividad de GFAP tras la exposición a EtOH y/o CTS (Figura 9) y la marcación de Faloidina (Figura 11) demostró que el citoesqueleto de actina F no presentó cambios con ninguno de los tratamientos.

En cuanto a S100 β , esta proteína pertenece a la familia S100 de proteínas de unión a calcio localizadas en el citoplasma y el núcleo de una variedad de células, incluidos los astrocitos. S100 β se une y compete con GFAP en el citoesqueleto de los astrocitos (Donato et al., 2009; Yang & Wang., 2015) y se considera un patrón molecular asociado a daño (DAMP), con la señalización de NF- κ B como una de sus principales vías subyacentes (Langeh & Singh, 2021). Nuestros resultados mostraron un aumento de las señales de S100 β tanto en el núcleo como en el citoplasma de los grupos EtOH y/o CTS respecto a los controles (Figura 10). Esto concuerda con resultados anteriores que muestran una tinción nuclear predominante en astrocitos de secciones de tejido normal (Olivera-Bravo et al., 2008; 2011; Díaz-Amarilla et al., 2011), pero una presencia citoplasmática preponderante en astrocitos reactivos y en fenotipos anómalos de astrocitos no senescentes altamente neurotóxicos y proliferantes (Díaz-Amarilla et al., 2011; Jiménez-Riani et al., 2017). Los resultados obtenidos respecto a la inmunorreactividad de S100 β indican claramente su aumento los compartimentos nuclear y citoplasmático, lo que sugiere eventos posteriores asociados con cascadas inflamatorias dependientes de S100 β (Davis & Syapin, 2004; Donato et al., 2009) o una relocalización de proteínas que parece estar asociada con la respuesta a la lesión previamente descrita (Díaz-Amarilla et al., 2011; Jiménez-Riani et al., 2017). Dicha relocalización entre diferentes compartimentos celulares se observó previamente en proteínas citoplasmáticas o de membrana que se encuentran como parte del nucleoesqueleto (Philimonenko et al., 2004; Pellegrini & Budman, 2005; McCrea & Gottardi 2016; Saez & González-Granado, 2022); o como coactivadores o correpresores transcripcionales nucleares (Philimonenko et al., 2004; Pellegrini & Budman, 2005; Hobbs et al., 2016; McCrea & Gottardi, 2016). Por tanto, los resultados indican que a pesar del aumento de BAX (Figura 8), no se observaron cambios morfológicos típicos de apoptosis como la reducción del tamaño nuclear o en la compactación de la cromatina (picnosis) ni signos de reactividad según lo evaluado en las imágenes DIC (Figura 10), la inmunorreactividad de GFAP (Figura 9A) y la señal de faloidina (Figura 11). Estos resultados sugieren que la duración de los tratamientos no fue lo suficientemente prolongada como para producir la desorganización de actina reportada previamente (Guerri et al., 2001; Lau et al., 2011). Por lo tanto, las funciones

que dependen del citoesqueleto de actina no se verían tempranamente afectadas a pesar de la inducción de daño significativo en el ADN.

Sin embargo, no podemos descartar una respuesta de los astrocitos similar a la reactividad asociada a DDR como lo sugieren los resultados obtenidos al analizar la inmunoreactividad a la Ciclina D1, APE1 y BAX y los cambios en la inmunoreactividad de S100 β . En línea con esta posibilidad, se observó un mayor número de nucléolos por núcleo en astrocitos expuestos a CTS con una clara tendencia al aumento en los tratamientos con EtOH y EtOH+CTS (Figura 12). Aunque el aumento del número de nucleólos se vinculó clásicamente con una mayor probabilidad de desarrollar cáncer (Weeks et al., 2019), la evidencia reciente sugiere que el nucléolo desempeña funciones críticas en muchas actividades celulares que incluyen la respuesta a factores estresantes, el mantenimiento de la estabilidad del genoma y la reparación de daños en el ADN (Weeks et al., 2019). Además, dado que también se observaron señales de Ciclina D1 y APE1 dentro de los nucléolos (regiones redondeadas elevadas en los núcleos de las Figuras 5 y 7) éstas podrían estar relacionadas en parte con posibles interacciones nucléolo-nucleoplasma como las reportadas recientemente (Pederson, 2011; Weeks et al., 2019), lo cual sería interesante abordar en el futuro.

Modulación de la comunicación astrocitaria vía nanotubos (NTs) y vesículas extracelulares (VEs)

El segundo punto fuerte de este trabajo de tesis fue identificar cambios en la superficie de los astrocitos inmediatamente después de la exposición de 1h a EtOH y/o CTS caracterizados por modificaciones en la cantidad, morfología, tamaño, tipo y distribución de NTs y VEs. Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que la señalización de los astrocitos puede modularse rápidamente luego de un corto tratamiento, como se esperaba para estas células que están a cargo de la homeostasis del SNC (Sofroniew & Vinters, 2010) y exhiben una gran cantidad de estrategias de comunicación celular. En cuanto a la morfología de las VEs, reconocemos que es difícil clasificar con precisión una variedad compleja de VEs basándose únicamente en su tamaño y características (guía MISVE2018), ya que habría que considerar aspectos relacionados con su composición, función, tejido de origen y estado funcional (Théry et al., 2018). Se pueden ver descripciones de varios de estos aspectos en Raposo & Stoorvogel (2013), Urbanelli et al. (2013), El Andaloussi et al. (2013), Crescitelli et al. (2013), Van der Pol et al. (2014), Ma et al. (2015), Yáñez-Mo et al. (2015), Théry et al. (2018), Van Niel et al. (2018), Atkin-Smith et al. (2017), Van Niel et al. (2018), Latifkar et al. (2019), Elzanowska et al. (2020), Battistelli & Falcieri (2020), Sun et al. (2021), Malenica et al. (2021) y Di Daniele et al. (2022).

Sin embargo, pudimos discriminar VEs de distintos tamaños y características que coincidían con las descripciones publicadas anteriormente, especialmente las morfologías y clasificaciones informadas por Malenica et al. (2021), y Di Daniele et al. (2022) (Figuras 14-16). Aunque el enfoque metodológico utilizado (MEB) no permite la confirmación del tipo de VEs, como lo hace la microscopía electrónica de transmisión y es necesario confirmarlo con enfoques complementarios, podemos sugerir, en base a su tamaño y morfología, que la mayoría de las VEs oscilaban entre exómeros (previamente reportados como nanopartículas no membranosas) hasta pequeños ectosomas, en todas las condiciones. Sin embargo, las VEs más pequeñas (exómeros y exosomas pequeños), predominaron en los controles, ya que probablemente están más asociados con funciones celulares normales. Mientras que las más grandes son compatibles con migrasomas grandes (observados previamente en las puntas de las fibras de retracción de las células migratorias), cuerpos apoptóticos (formados durante la fase tardía de la apoptosis). Las VEs gigantes son complejas y, parecen estar asociadas con la respuesta celular a una injuria importante, ya que sólo fueron identificadas, con poca frecuencia, en condiciones de daño (Figura 17). Los diferentes tipos de VEs se generan mediante distintos procesos celulares y la composición de las vesículas extracelulares refleja el estado fisiológico o fisiopatológico de las células de origen (Malenica, et al., 2021). La complejidad y heterogeneidad de las VEs observadas en las superficies de los astrocitos podría reflejar la coexistencia de diferentes eventos celulares, relacionados con su producción (Raposo & Stoorvogel, 2013; Urbanelli et al., 2013; El Andaloussi et al., 2013; Van der Pol et al., 2014; Yáñez-Mo et al., 2015; Atkin-Smith et al., 2017; Van Niel et al., 2018; Latifkar et al., 2019; Elzanowska et al., 2020; Sun et al., 2021). Pueden ser los mismos mecanismos presentes en los controles, pero con un mayor grado de activación, o podrían operar otros mecanismos asociados con las circunstancias del daño (Crescitelli et al., 2013; Ma et al., 2015; Battistelli & Falcieri., 2020), ya que las VEs más grandes solo se observaron en astrocitos con daño en el ADN.

Aunque la evaluación de VEs en este trabajo solo incluyó sus características morfológicas más destacables y su densidad, las diferencias inequívocas en ambos parámetros nos permitirían sugerir variaciones significativas en su contenido (Lázaro-Ibáñez et al., 2019), aunque no hemos determinado las características de sus cargos en este trabajo. En este sentido, se describió una tasa creciente de exocitosis dependiente de calcio en astrocitos tratados con CTS (Castellino et al., 1992; Cereseto et al., 2006), así como un aumento en la secreción de VEs con cargas proteicas relacionadas con la inflamación tras la incubación con EtOH (Ibáñez et al., 2019) y con una gama más amplia de funciones patológicas descritas en muchas condiciones neurológicas (Petgel et al., 2014). La modificación de la carga de las VEs se ha observado también ante la presencia de

agregados proteicos tóxicos, provocando estrés oxidativo, neuroinflamación o disfunción sináptica (Chaudhuri et al., 2018; Li et al., 2021; Zhao et al., 2021). Sin embargo, las VEs poseen también funciones beneficiosas. Se ha descrito su participación en la neuroprotección, la preservación de la función neuronal y la reparación del daño neuronal (Zhao et al., 2021). Por ejemplo, fue reportado que el medio condicionado de astrocitos protegía a las neuronas hipocámpales en cultivo contra el daño inducido por CTS (Zhu et al., 2006), sugiriendo la comunicación entre estas células.

Se conoce también que, en circunstancias fisiológicas o patológicas, los astrocitos se comunican con otras células cerebrales a través de NTs (Rustom et al., 2004; Sun et al., 2012; Franchi et al., 2020; Valdebenito et al., 2021; Khattar et al., 2022). En nuestros cultivos de astrocitos observamos NTs con diferentes características, algunos conectados a células más o menos distantes, permitiendo la comunicación directa entre ellas o facilitando la transferencia de VEs en su superficie y/o en su interior, como observamos en algunos casos (Figura 15). En este sentido, es interesante mencionar que se ha descrito la presencia de exosomas y organelos, como mitocondrias dentro de las NTs (Lu et al., 2017; Sartori-Rupp et al., 2019). Se ha reportado que el desarrollo de NTs en astrocitos cultivados del hipocampo puede depender de la activación del gen p53 (Wang et al., 2011), un gen central en la DDR. De modo que cuando p53 se activa después del daño en el ADN, no sólo regula el control del ciclo celular, la reparación del ADN, la senescencia y las vías de apoptosis, (Ou & Schumacher., 2018; Mohammadzadeh et al., 2019), también podría estar involucrado en las modificaciones de los NTs.

Es interesante destacar el hecho que la frecuencia de NTs disminuye en los astrocitos expuestos a EtOH y/o CTS a expensas de un aumento de VEs, lo que sugiere un tipo de interacción relacionada con la inducción de daño, lo cual requiere un estudio futuro más profundo. También encontramos una relación inversa entre las frecuencias NTs y VEs, presentando los astrocitos tratados con EtOH las frecuencias NTs más bajas y VEs más altas, y los controles, el comportamiento inverso. Podríamos especular que diferentes circunstancias de injuria podrían influir modalidades diferenciales de señalización celular, favoreciendo la señalización vesicular a larga distancia a expensas de la comunicación célula a célula a través de NTs. Además, en algunas circunstancias podría facilitarse la producción de VEs. En este sentido, se ha reportado que, como efecto inicial, el EtOH aumenta la fluidez de las membranas biológicas (Rubin & Rottenberg, 1983).

Por lo tanto, los cambios en los mecanismos de señalización de los astrocitos pueden tener un impacto protector o dañino significativo en las neuronas y otras células gliales (Verkhatsky et al., 2019; Maragakis & Rothstein, 2006; Upadhyay et al., 2020), y su impacto

potencial en aspectos clínicos se considera cada vez con más frecuencia (Tkach & Théry, 2016; Khattar et al., 2022; Nakhle et al., 2023). También podríamos especular que, dado el papel de los astrocitos en el mantenimiento de la homeostasis del SNC, estos cambios podrían intervenir en mecanismos con capacidad de revertir el daño del ADN y/o sus consecuencias celulares, permitiéndoles preservar sus funciones.

CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados obtenidos proporcionan evidencias de la sensibilidad de los astrocitos hipocampales al daño inducido en el ADN por exposición aguda a EtOH y CTS. Asimismo, proporcionan evidencias sobre su capacidad de respuesta inmediata, activando la DDR y modificando su repertorio de señalización celular, sin reactividad detectable morfológicamente. Sin embargo, las modificaciones en la inmunoreactividad de S100B y BAX no permiten excluir etapas iniciales de reactividad típica. Se necesitarían realizar futuros experimentos para identificar los mecanismos subyacentes a los cambios observados y el efecto mediado por astrocitos sobre la supervivencia neuronal y el mantenimiento de la homeostasis del SNC.

Como reflexión final, a pesar que clásicamente, la DDR es un conjunto de vías que operan esencialmente a nivel nuclear y mitocondrial, consideramos que las células responderían como un solo sistema modulando procesos diferentes para asegurar su supervivencia y la del organismo que integran. En este sentido, fue reportado que la exposición local de las células a bajas dosis de radiación ionizante provocaba cambios biológicos similares en células no irradiadas directamente, dando sustento al concepto de efecto *bystander* (espectador) (Nagasawa & Little, 1992; Mothersill & Seymour, 2001; Little & Azzam, 2002; Azzam & Little, 2004). Posteriormente, se detectó el mismo efecto con otros agentes, proponiéndose que el efecto espectador dependería de la liberación de mediadores químicos, algunos transportados como cargas en las VEs (Verma & Tiku, 2017).

Pensamos que la modulación del repertorio de NTs y VEs de los astrocitos con daño genético podría representar un mecanismo celular de respuesta que opera junto a las vías clásicas de la DDR. Es interesante destacar, que en algunas VEs se detectó la presencia de ADN nuclear y mitocondrial dañado, por lo cual se sugirió que su introducción en las VEs podía representar un mecanismo de eliminación de ADN dañado (Kalluri & LeBleu, 2016). Asimismo, en nuestras imágenes confocales + DIC de astrocitos tratados que fueron teñidos con azul de toluidina observamos VEs con cargas de ácido nucleico (Figura 19 y 20).

Basándonos en nuestros hallazgos hipotetizamos que probablemente el astrocito responde al daño en el ADN poniendo en marcha diferentes mecanismos que no sólo involucran las vías canónicas de la DDR, sino que esta respuesta también incluye vías que regulan el repertorio de señalización y la reactividad celular.

PERSPECTIVAS

- 1- Considerando que el consumo agudo de EtOH produce incremento constante de CTS a lo largo de cada episodio de exposición (Cippitelli et al., 2014), será importante determinar la contribución relativa de los niveles de glucocorticoides frente a la exposición a EtOH y cuánto influye sobre la citotoxicidad propia del EtOH en un modelo *in vivo*.
- 2- El análisis cuantitativo y morfológico de las VEs y los NTs reportado se profundizará, y se identificarán las conexiones entre el daño genético de los astrocitos, la evolución de la DDR, los patrones de comunicación célula-célula y su impacto en otras células neurales.
- 3- Los estudios *in vitro* con astrocitos han sido valiosos para definir los mecanismos por los cuales el EtOH modula la respuesta celular de la glía. Sin embargo, estos estudios deben interpretarse con precaución ya que se sabe que el fenotipo transcripcional de la glía cambia cuando se modifica su entorno nativo. Es por ello que será pertinente evaluar los efectos de la exposición aguda a EtOH y/o CTS sobre la integridad del ADN y la DDR en un modelo preclínico.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahao, K. P., Salinas, A. G., and Lovinger, D. M. (2017). Alcohol and the brain: neuronal molecular targets, synapses, and circuits. *Neuron* 96 (6), 1223–1238. doi:10.1016/j.neuron.2017.10.032
- Abbotts, R., & Wilson, D. M., 3rd (2017). Coordination of DNA single strand break repair. *Free radical biology & medicine*, 107, 228–244. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039>
- Adermark L. and Bowers M. S., (2006) “Disentangling the role of astrocytes in alcohol use disorder,” *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, vol. 40, no. 9, pp. 1802–1816, 2016.
- Adermark, L., and Bowers, M. S. (2016). Disentangling the Role of Astrocytes in Alcohol Use Disorder. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 40(9), 1802–1816. <https://doi.org/10.1111/acer.13168>.
- Anderson, M. A., Burda, J. E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B. S., Deming, T. J., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*, 532(7598), 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature17623>
- Ashkenazi A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature reviews. Cancer*, 2(6), 420–430. <https://doi.org/10.1038/nrc821>
- Atsumi, Y., Minakawa, Y., Ono, M., Dobashi, S., Shinohe, K., Shinohara, A., Takeda, S., Takagi, M., Takamatsu, N., Nakagama, H., Teraoka, H., & Yoshioka, K. (2015). ATM and SIRT6/SNF2H Mediate Transient H2AX Stabilization When DSBs Form by Blocking HUWE1 to Allow Efficient γ H2AX Foci Formation. *Cell reports*, 13(12), 2728–2740. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.054>
- Alhaddad, H., Gordon, D.M., Bell, R. L., Jarvis, E. E., Kipp, Z. A., Hinds, T. D., Jr, et al. (2020). Chronic ethanol consumption alters glucocorticoid receptor isoform expression in stress neurocircuits and mesocorticolimbic brain regions of alcohol-preferring rats. *Neurosci* 437, 107–116. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.04.033
- Alfonso-Loeches, S., Ureña-Peralta, J.R., Morillo-Bargues, M. J., Oliver-De La Cruz, J., & Guerri, C. (2014) Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(AUG). Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00216>.
- Amente, S., Di Palo, G., Scala, G., Castrignanò, T., Gorini, F., Cocozza, S., et al. (2019). Genome-wide mapping of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine reveals accumulation of oxidatively-generated damage at DNA replication origins within transcribed long genes of mammalian cells. *Nucleic Acid. Res.* 47 (1), 221–236. doi:10.1093/nar/gky1152
- Askalan, R., Deveber, G., Ho, M., Ma, J., and Hawkins, C. (2006). Astrocytic-inducible nitric oxide synthase in the ischemic developing human brain. *Ped. Res.* 60 (6), 687–692. doi: 10.1203/01.pdr.0000246226.89215.a6
- Akuwudike, P., López-Riego, M., Marczyk, M., Kocibalova, Z., Brückner, F., Polańska, J., Wojcik, A., & Lundholm, L. (2023). Short- and long-term effects of radiation exposure at low dose and low dose rate in normal human VH10 fibroblasts. *Frontiers in public health*, 11, 1297942. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1297942>

Allen, A.P. et al. (2014) 'Biological and psychological markers of stress in humans: Focus on the Trier Social Stress Test', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 38, pp. 94–124. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.11.005>.

Atkin-Smith, G. K., & Poon, I. K. H. (2017). Disassembly of the Dying: Mechanisms and Functions. *Trends in cell biology*, 27(2), 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.011>.

Azzam, E. I., & Little, J. B. (2004). The radiation-induced bystander effect: evidence and significance. *Human & experimental toxicology*, 23(2), 61–65. <https://doi.org/10.1191/0960327104ht418oa>.

Bachu, A. K., Davis, V., Abdulrahim, M., Harbaugh, L., Prasad, S., Kotapati, V. P., & Srinivas, S. (2023). Corticosteroid-Induced Psychosis: A Report of Three Cases. *Cureus*, 15(5), e39221. <https://doi.org/10.7759/cureus.39221>

Bartek, J., Bartkova, J., & Lukas, J. (2007). DNA damage signaling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene*, 26(56), 7773–7779. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210881>.

Bayer T. A. (2015). Proteinopathies, a core concept for understanding and ultimately treating degenerative disorders?. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 25(5), 713–724. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.03.007>

Bayraktar, O. A., Bartels, T., Holmqvist, S., Kleshchevnikov, V., Martirosyan, A., Polioudakis, D., Ben Haim, L., Young, A. M. H., Batiuk, M. Y., Prakash, K., Brown, A., Roberts, K., Paredes, M. F., Kawaguchi, R., Stockley, J. H., Sabeur, K., Chang, S. M., Huang, E., Hutchinson, P., Ullian, E. M., ... Rowitch, D. H. (2020). Astrocyte layers in the mammalian cerebral cortex revealed by a single-cell in situ transcriptomic map. *Nature neuroscience*, 23(4), 500-509. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0602-1>

Bae, J. R., & Kim, S. H. (2017). Synapses in neurodegenerative diseases. *BMB reports*, 50(5), 237–246. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.5.038>

Baek, J. H., Kim, B. M., Kim, D. J., Heo, J. H., Nam, H. S., and Yoo, J. (2016). Stenting as a rescue treatment after failure of mechanical thrombectomy for anterior circulation large artery occlusion. *Stroke* 47 (9), 2360–2363. doi:10.1161/STROKEAHA.116.014073

Bekhat, M., Glasper, E. R., Rowson, S. A., Kelly, S. D., & Neigh, G. N. (2018). Measuring corticosterone concentrations over a physiological dynamic range in female rats. *Physiology & behavior*, 194, 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.04.033>

Basso, M., Pozzi, S., Tortarolo, M., Fiordaliso, F., Bisighini, C., Pasetto, L., Spaltro, G., Lidonnici, D., Gensano, F., Battaglia, E., Bendotti, C., & Bonetto, V. (2013). Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of biological chemistry*, 288(22), 15699–15711. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.425066>.

Brat, D.J. (2010) *Normal Brain Histopathology*. 1st edn, *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach*. 1st edn. Elsevier Inc. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06982-6.00002-X>.

Barral, S. et al. (2014) 'Phosphorylation of histone H2AX in the mouse brain from development to senescence', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), pp. 1554–1573. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms15011554>.

- Brenner, M., Johnson, A. B., Boespflug-Tanguy, O., Rodriguez, D., Goldman, J. E., & Messing, A. (2001). Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nature genetics*, 27(1), 117–120. <https://doi.org/10.1038/83679>
- Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic bodies: particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. *Biology*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/biology9010021>.
- Besson, H., Ekelund, U., Brage, S., Luben, R., Bingham, S., Khaw, K. T., & Wareham, N. J. (2008). Relationship between subdomains of total physical activity and mortality. *Medicine and science in sports and exercise*, 40(11), 1909–1915. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318180bcad>
- Bonfiglio, T., Biggi, F., Bassi, A. M., Ferrando, S., Gallus, L., Loiacono, F., & Masini, M. A. (2019). Simulated microgravity induces nuclear translocation of Bax and BCL-2 in glial cultured C6 cells. *Heliyon*, 5(6), e01798. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01798>.
- Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular immunology*, 39(11), 615–647. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(02\)00252-3](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(02)00252-3).
- Brayer, S., Joannes, A., Jaillet, M., Gregianin, E., Mahmoudi, S., Marchal Sommé, J., Fabre, A., Mordant, P., Cazes, A., Crestani, B., & Mailleux, A. A. (2017). The pro-apoptotic BAX protein influences cell growth and differentiation from the nucleus in healthy interphasic cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 16(21), 2108–2118. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1371882>.
- Borges, H. L., Linden, R., & Wang, J. Y. (2008). DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system. *Cell research*, 18(1), 17–26. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.110>
- Barchiesi, A. et al. (2021a) 'DNA Repair Protein APE1 Degrades Dysfunctional Abasic mRNA in Mitochondria Affecting Oxidative Phosphorylation', *Journal of Molecular Biology*, 433(18). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167125>.
- Bendris, N., Lemmers, B., and Blanchard, J. M. (2015). Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell cycle* 14, 12 1786–1798. doi:10.1080/15384101.2014.998085
- Brown, N. E., Jeselsohn, R., Bihani, T., Hu, M. G., Foltopoulou, P., Kuperwasser, C., et al. (2012). Cyclin D1 activity regulates autophagy and senescence in the mammary epithelium. *Cancer Res.* 72 (24), 6477–6489. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4139
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276 (45), 42462–42467. doi:10.1074/jbc.C100466200
- Bylicky, M. A., Mueller, G. P., & Day, R. M. (2018). Mechanisms of Endogenous Neuroprotective Effects of Astrocytes in Brain Injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 6501031. <https://doi.org/10.1155/2018/6501031>
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(1), 183–192. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002>
- Boulay, A. C., Saubaméa, B., Adam, N., Chasseigneaux, S., Mazaré, N., Gilbert, A., Bahin, M., Bastianelli, L., Blugeon, C., Perrin, S., Pouch, J., Ducos, B., Le Crom, S., Genovesio, A., Chrétien, F., Declèves, X., Laplanche, J. L., & Cohen-Salmon, M. (2017). Translation in astrocyte distal processes sets molecular heterogeneity at the gliovascular interface. *Cell discovery*, 3, 17005. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.5>

- Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de León, A., Robinson, K. M., Mason, R. P., Beckman, J. S., Barbeito, L., & Radi, R. (2008). Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(16), 4115–4122. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5308-07.2008>
- Caldecott, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat. Rev. Gen.* 9 (8), 619–631. doi: 10.1038/nrg2380
- Caldecott K. W. (2022). DNA single-strand break repair and human genetic disease. *Trends in cell biology*, 32(9), 733–745. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.04.010>
- Castellino, F., Heuser, J., Marchetti, S., Bruno, B., and Luini, A. (1992). Glucocorticoid stabilization of actin filaments: a possible mechanism for inhibition of corticotropin release. *PNAS* 89 (9), 3775–3779. doi:10.1073/pnas.89.9.3775
- Cereseto, M., Reínés, A., Ferrero, A., Sifonios, L., Rubio, M., and Wikinski, S. (2006). Chronic treatment with high doses of corticosterone decreases cytoskeletal proteins in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 24 (12), 3354–3364. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05232.x
- Chai, J., Li, Y. and Wang, H. (2015) ‘DNA Damage and Repair, Neurodegeneration and the Role of Purα in DNA Repair’, 7(4), pp. 1–9.
- Chaudhuri, A.D., Dastgheyb, R.M., Yoo, S. W., Trout, A., Talbot, C. C., Jr, Hao, H., Witwer, K. W., & Haughey, N. J. (2018). TNFα and IL-1β modify the miRNA cargo of astrocyte shed extracellular vesicles to regulate neurotrophic signaling in neurons. *Cell death & disease*, 9(3), 363. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0369-4>.
- Chainy, G. B. N., and Sahoo, D. K. (2020). Hormones and oxidative stress: an overview. *Free Radic. Res.* 54 (1), 1–26. doi:10.1080/10715762.2019.1702656
- Chen, J., & Cao, J. (2021). Astrocyte-to-neuron transportation of enhanced green fluorescent protein in cerebral cortex requires F-actin dependent tunneling nanotubes. *Scientific reports*, 11(1), 16798. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96332-5>.
- Chen, X., & Holtzman, D. M. (2022). Emerging roles of innate and adaptive immunity in Alzheimer's disease. *Immunity*, 55(12), 2236–2254. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.10.016>
- Chinta, S.J. et al. (2015) ‘Cellular senescence and the aging brain’, *EXG*, 68, pp. 3–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.09.018>.
- Choi, S., Shin, J. H., Lee, Y. R., Joo, H. K., Song, K. H., Na, Y. G., et al. (2016). Urinary APE1/Ref-1: a potential bladder cancer biomarker. *Dis. Mark.* 7276502, 7276502. doi:10.1155/2016/7276502
- Chipuk, J.E., Kuwana T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., & Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303, 1010-4. <https://doi:10.1126/science.1092734>.
- Chipuk, J.E., & Green D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cellular Biology*, 18(4), 157-164. <https://doi:10.1016/j.tcb.2008.01.007>.
- Ciapa, B., and Granon, S. (2018). Expression of cyclin-D1 in astrocytes varies during aging. *Front. Aging Neurosci.* 10, 104. doi:10.3389/fnagi.2018.00104

- Cippitelli, A., Damadzic, R., Hamelink, C., Brunnquell, M., Thorsell, A., Heilig, M., & Eskay, R. L. (2014). Binge-like ethanol consumption increases corticosterone levels and neurodegeneration whereas occupancy of type II glucocorticoid receptors with mifepristone is neuroprotective. *Addiction biology*, 19(1), 27–36. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2012.00451.x>
- Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in cell biology*, 25(6), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>.
- Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinská, M., Kennedy, G., & Stětina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us?. *Mutation research*, 375(2), 183–193. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(97\)00013-4](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00013-4)
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17: 1195-1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>.
- Cook, P. J., Ju, B. G., Telese, F., Wang, X., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2009). Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature*, 458(7238), 591–596. <https://doi.org/10.1038/nature07849>.
- Crescitelli R., Lässer C., Szabo T. G. et al., (2013) “Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes,” *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 2, no. 1, p. 20677.
- Crews, F.T. and Nixon, K. (2009) ‘Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism’, *Alcohol and Alcoholism*, 44(2), pp. 115–127. Available at: <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn079>.
- Davis, R. L., and Syapin, P. J. (2004). Ethanol increases nuclear factor-kappa B activity in human astroglial cells. *Neurosci. Lett.* 371 (2-3), 128–132. doi: 10.1016/j.neulet.2004.08.051
- Davis, A. J., & Chen, D. J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl cancer res*, 2(3), 130-143.
- De Kloet, E. R., Karst, H., & Joëls, M. (2008). Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), 268–272. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.10.002>
- Di Daniele, A., Antonucci, Y., & Campello, S. (2022). Migrasomes, new vesicles as Hansel and Gretel white pebbles? *Biology direct*, 17(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13062-022-00321-1>.
- Di Tomaso, M., Basso, S., Lafon-Hughes, L., Saona, G., López-Carro, B., Reyes-Ábalos, A. & Liddle, P. (2014). Spontaneous and Bleomycin-Induced γH2AX Signals in CHO9 Metaphase Chromosomes. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 603-616. doi: 10.4236/abb.2014.57071.
- Ding, D., Zhang, Y., Wang, J., Wang, X., Fan, D., He, L., Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., & Chen, H. (2016). γ-H2AX/53BP1/pKAP-1 foci and their linear tracks induced by in vitro exposure to radon and its progeny in human peripheral blood lymphocytes. *Scientific reports*, 6, 38295. <https://doi.org/10.1038/srep38295>
- Díaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trias, E., Cragolini, A., Martínez-Palma, L., Cassina, P., et al. (2011). Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *PNAS* 108 (44), 18126–18131. doi:10.1073/pnas.1110689108
- Dickey, J. S., Redon, C. E., Nakamura, A. J., Baird, B. J., Sedelnikova, O. A., & Bonner, W. M. (2009). H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma*, 118(6), 683–692. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0234-4>
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., et al. (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *BBA* 1793 (6), 1008–1022. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.11.009

- Dimitroglou, E. et al. (2003) 'DNA damage in a human population affected by chronic psychogenic stress.', *International journal of hygiene and environmental health*, 206(1), pp. 39–44. Available at: <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00187>.
- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., McEwen, B. S., & Manji, H. K. (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3543–3548. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812671106>.
- Duclos, M., Gouarne, C., Martin, C., Rocher, C., Mormède, P., & Letellier, T. (2004). Effects of corticosterone on muscle mitochondria identifying different sensitivity to glucocorticoids in Lewis and Fischer rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 286(2), E159–E167. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00281.2003>.
- Duman, R. S., Nakagawa, S., & Malberg, J. (2001). Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 25(6), 836–844. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00358-X](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00358-X)
- Duman R. S. (2002). Synaptic plasticity and mood disorders. *Molecular psychiatry*, 7 Suppl 1, S29–S34. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001016>
- Durkee, C. A., & Araque, A. (2019). Diversity and Specificity of Astrocyte-neuron Communication. *Neuroscience*, 396, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.010>.
- El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(5), 347–357. <https://doi.org/10.1038/nrd3978>.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- Elzanowska J., Semira C., and Costa-Silva B., (2021) "DNA in extracellular vesicles: biological and clinical aspects," *Molecular Oncology*, vol. 15, no. 6, pp. 1701–1714.
- Escartin, C., Guillemaud, O., and Carrillo-de Sauvage, M. A. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia* 67, 2221–2247. doi: 10.1002/glia. 23687
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., Cunningham, C., & Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature neuroscience*, 24(3), 312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>.
- Falchi, A. M., Sogos, V., Saba, F., Piras, M., Congiu, T., & Piludu, M. (2013). Astrocytes shed large membrane vesicles that contain mitochondria, lipid droplets and ATP. *Histochemistry and cell biology*, 139(2), 221–231. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1045-x>.
- Fernández-Hernández, R., Rafel, M., Fusté, N. P., Aguayo, R. S., Casanova, J. M., Egea, J., Ferrezuelo, F., & Garí, E. (2013). Cyclin D1 localizes in the cytoplasm of keratinocytes during skin differentiation and regulates cell-matrix adhesion. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(15), 2510–2517. <https://doi.org/10.4161/cc.25590>
- Flint, M. S., Baum, A., Chambers, W. H., & Jenkins, F. J. (2007). Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. *Psychoneuroendocrinology*, 32(5), 470–479. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.02.013>.

- Flaherty, R. L., Owen, M., Fagan-Murphy, A., Intabli, H., Healy, D., Patel, A., et al. (2017). Glucocorticoids induce production of reactive oxygen species/reactive nitrogen species and DNA damage through an iNOS mediated pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 19 (1), 35–13. doi:10.1186/s13058-017-0823-8
- Franchi, M., Piperigkou, Z., Riti, E., Masola, V., Onisto, M., & Karamanos, N. K. (2020). Long filopodia and tunneling nanotubes define new phenotypes of breast cancer cells in 3D cultures. *Matrix biology plus*, 6-7, 100026. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2020.100026>.
- Frock, R. L., Hu, J., Meyers, R. M., Ho, Y. J., Kii, E., & Alt, F. W. (2015). Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nature biotechnology*, 33(2), 179–186. <https://doi.org/10.1038/nbt.3101>
- Fritz, G. (2000). Human APE/Ref-1 protein. *Intl. J. Biochem. Cell Biol.* 32 (9), 925–929. doi:10.1016/s1357-2725(00)00045-5
- Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T., and Pestell, R. G. (2004). Minireview: cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinol* 145 (12), 5439–5447. doi:10.1210/en.2004-0959
- Füllgrabe, J., Hajji, N. and Joseph, B. (2010) 'Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications.', *Cell death and differentiation*, 17(8), pp. 1238–1243. Available at: <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.58>.
- García-Cáceres, C., Lagunas, N., Calmarza-Font, I., Azcoitia, I., Diz-Chaves, Y., García-Segura, L. M., et al. (2010). Gender differences in the long-term effects of chronic prenatal stress on the HPA axis and hypothalamic structure in rats. *Psychoneuroendocrinology* 35 (10), 1525–1535. doi: 10.1016/j.psyneuen.2010.05.006
- Galluzzi, L. et al. (2009) 'Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009', *Cell Death Differ*, 16(1), pp. 3–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>.
- Gallo, V., & Deneen, B. (2014). Glial development: the crossroads of regeneration and repair in the CNS. *Neuron*, 83(2), 283–308. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.010>
- Guerrero, A.M. et al. (2015) Patología neurológica en intoxicaciones y consumo de drogas. Manifestaciones neurológicas de las formas agudas y crónicas del alcoholismo Palabras Clave: Keywords: Revista de la educación superior. Elsevier España, S.L.U. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.med.2015.03.013>.
- Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., Watkins, P. C., Ottina, K., Wallace, M. R., & Sakaguchi, A. Y. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306(5940), 234–238. <https://doi.org/10.1038/306234a0>
- Goeke, C. M., Roberts, M. L., Hashimoto, J. G., Finn, D. A., & Guizzetti, M. (2018). Neonatal Ethanol and Choline Treatments Alter the Morphology of Developing Rat Hippocampal Pyramidal Neurons in Opposite Directions. *Neuroscience*, 374, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.031>
- Gonthier, B., Allibe, N., Cottet-Rousselle, C., Lamarche, F., Nuiry, L., and Barret, L. (2012). Specific conditions for resveratrol neuroprotection against ethanol-induced toxicity. *J. Toxicol.* 973134, 973134. doi:10.1155/2012/973134
- Gormally, B. M. G., Fuller, R., McVey, M., & Romero, L. M. (2019). DNA damage as an indicator of chronic stress: Correlations with corticosterone and uric acid. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 227, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.007>.

Guerri, C., Pascual, M., & Renau-Piqueras, J. (2001). Glia and fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology*, 22(5), 593–599. [https://doi.org/10.1016/s0161-813x\(01\)00037-7](https://doi.org/10.1016/s0161-813x(01)00037-7).

Guerri, C., Sáez, R., Sancho-Tello, M., Martín de Aquilera, E., and Renau-Piqueras, J. (1990). Ethanol alters astrocyte development: a study of critical periods using primary cultures. *Neurochem. Res.* 15 (5), 559–565. doi:10.1007/BF00966217

Hari, P., Millar, F. R., Tarrats, N., Birch, J., Quintanilla, A., Rink, C. J., Fernández-Duran, I., Muir, M., Finch, A. J., Brunton, V. G., Passos, J. F., Morton, J. P., Boulter, L., & Acosta, J. C. (2019). The innate immune sensor Toll-like receptor 2 controls the senescence-associated secretory phenotype. *Science advances*, 5(6), eaaw0254.

Haber, M., Zhou, L., & Murai, K. K. (2006). Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(35), 8881–8891. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1302-06.2006>

Haghighat, N., McCandless, D. W., & Geramijad, P. (1999). Effect of alcohol on energy storage of primary astrocytes and C6-glioma cells in vitro. *Metabolic brain disease*, 14(3), 149–156. <https://doi.org/10.1023/a:1020606607729>

Haseleu, J., Anlauf, E., Blaess, S., Endl, E., & Derouiche, A. (2013). Studying subcellular detail in fixed astrocytes: dissociation of morphologically intact glial cells (DIMIGs). *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 54. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00054>

Havaki, S. et al. (2015) ‘The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect’, *Cancer Letters*, 356(1), pp. 43–51. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.023>.

Heckman, C. A., Urban, J. M., Cayer, M., Li, Y., Boudreau, N., Barnes, J., et al. (2004). Novel p21-activated kinase-dependent protrusions characteristically formed at the edge of transformed cells. *Exp. Cell. Res.* 295 (2), 432–447. doi: 10.1016/j.yexcr.2003.12.020

Hobbs, R. P., Jacob, J. T., and Coulombe, P. A. (2016). Keratins are going nuclear. *Dev. Cell.* 38 (3), 227–233. doi: 10.1016/j.devcel.2016.07.022

Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology*, 15(10), 565–581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>

Holownia, A., Ledig, M., and Ménez, J. F. (1997). Ethanol-induced cell death in cultured rat astroglia. *Neurotoxicol. Teratol.* 19 (2), 141–146. doi:10.1016/s0892-0362(96)00226-7

Hisaoka-Nakashima, K., Azuma, H., Ishikawa, F., Nakamura, Y., Wang, D., Liu, K., Wake, H., Nishibori, M., Nakata, Y., & Morioka, N. (2020). Corticosterone Induces HMGB1 Release in Primary Cultured Rat Cortical Astrocytes: Involvement of Pannexin-1 and P2X7 Receptor-Dependent Mechanisms. *Cells*, 9(5), 1068. <https://doi.org/10.3390/cells9051068>

Huen, M. S., and Chen, J. (2008). The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res.* 18 (1), 8–16. doi:10.1038/cr.2007.109

Hill, J.W. et al. (2001) ‘Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: Potential coordination of the initial steps in base excision repair’, *Nucleic Acids Research*, 29(2), pp. 430–438. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/29.2.430>.

- Hirrlinger, J., Hülsmann, S., & Kirchhoff, F. (2004). Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *The European journal of neuroscience*, 20(8), 2235–2239. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03689.x>
- Ismail, I. H., Wadhwa, T. I., & Hammarsten, O. (2007). An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans. *Nucleic acids research*, 35(5), e36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1169>
- Izumi, T., and Mitra, S. (1998). Deletion analysis of human AP-endonuclease: minimum sequence required for the endonuclease activity. *Carcinogenesis* 19 (3), 525–527. doi:10.1093/carcin/19.3.525
- Jackson, S.P. & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>.
- Jasin, M., & Rothstein, R. (2013). Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(11), a012740.
- Jiang, W., Zhu, Z., Bhatia, N., Agarwal, R., and Thompson, H. J. (2002). Mechanisms of energy restriction: effects of corticosterone on cell growth, cell cycle machinery, and apoptosis. *Cancer Res.* 62 (18), 5280–5287.
- Jiang, R., Diaz-Castro, B., Looger, L. L., & Khakh, B. S. (2016). Dysfunctional Calcium and Glutamate Signaling in Striatal Astrocytes from Huntington's Disease Model Mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(12), 3453–3470. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3693-15.2016>
- Jiménez-Riani, M., Díaz-Amarilla, P., Isasi, E., Casanova, G., Barbeito, L., & Olivera-Bravo, S. (2017). Ultrastructural features of aberrant glial cells isolated from the spinal cord of paralytic rats expressing the amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1G93A mutation. *Cell and tissue research*, 370(3), 391–401. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2681-1>.
- Jirawatnotai, S., Hu, Y., Livingston, D. M., and Sicinski, P. (2012). Proteomic identification of a direct role for cyclin d1 in DNA damage repair. *Cancer Res.* 72 (17), 4289–4293. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3549
- Joo, H. K., Lee, Y. R., Lee, E.O., Park, M. S., Choi, S., Kim, C. S., et al. (2019). The extracellular role of Ref-1 as anti-inflammatory function in lipopolysaccharide-induced septic mice. *Free Radic. Biol. Med.* 139, 16–23. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.013
- John, G. R., Chen, L., Riviello, M. A., Melendez-Vasquez, C. V., Hartley, A., & Brosnan, C. F. (2004). Interleukin-1 β induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(11), 2837–2845. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4789-03.2004>
- Joshi, P. C., & Benerjee, S. (2018). Effects of glucocorticoids in depression: Role of astrocytes. *AIMS neuroscience*, 5(3), 200–210. <https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2018.3.200>.
- Jurga, A. M., Paleczna, M., Kadluczka, J., & Kuter, K. Z. (2021). Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules*, 11(9), 1361. <https://doi.org/10.3390/biom11091361>
- Kalluri, R., & LeBleu, V.S. (2016). Discovery of Double-Stranded Genomic DNA in Circulating Exosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 81, 275–280. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030932>.
- Khattar, K. E., Safi, J., Rodriguez, A. M., & Vignais, M. L. (2022). Intercellular Communication in the Brain through Tunneling Nanotubes. *Cancers*, 14(5), 1207. <https://doi.org/10.3390/cancers14051207>.

- Kido, R., Sato, I., & Tsuda, S. (2006). Detection of in vivo DNA damage induced by ethanol in multiple organs of pregnant mice using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *The Journal of veterinary medical science*, 68(1), 41–47. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.4.1>.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic acids research*, 36(17), 5678–5694. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn550>
- Klanova, M. and Klener, P. (2020) 'BCL-2 proteins in pathogenesis and therapy of B-Cell non-hodgkin lymphomas', *Cancers*, 12(4), pp. 1–21. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers12040938>.
- Koguchi, K., Nakatsuji, Y., Nakayama, K. I., and Sakoda, S. (2002). Modulation of astrocyte proliferation by cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Glia* 37 (2), 93–104. doi:10.1002/glia.10017
- Kok, J. R., Palminha, N.M., Dos Santos Souza, C., El-Khamisy, S. F., and Ferraiuolo, L. (2021). DNA damage as a mechanism of neurodegeneration in ALS and a contributor to astrocyte toxicity. *Cell. Mol. Life Sci.* 78 (15), 5707–5729. doi:10.1007/s00018-021-03872-0
- Krokan, H.E. & Bjørås, M. (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4) a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>.
- Kun, A., Otero, L., Sotelo-Silveira, J. R., and Sotelo, J. R. (2007). Ribosomal distributions in axons of mammalian myelinated fibers. *J. Neurosci. Res.* 85 (10), 2087–2098. doi:10.1002/jnr.21340
- Lana, D., Ugolini, F., Nosi, D., Wenk, G. L., & Giovannini, M. G. (2021). The Emerging Role of the Interplay Among Astrocytes, Microglia, and Neurons in the Hippocampus in Health and Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 13, 651973. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.651973>
- Laiho, M. & Latonen, L. (2003). Cell cycle control, DNA damage checkpoints and cancer. *Annals of medicine*, 35(6), 391–397. <https://doi.org/10.1080/07853890310014605>.
- Lafon-Hughes, L., Di Tomaso, M. V., Liddle, P., Toledo, A., Reyes-Ábalos, A. L., & Folle, G. A. (2013). Preferential localization of γH2AX foci in euchromatin of retina rod cells after DNA damage induction. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, 21(8), 789–803. <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9395-3>
- Lamarque, F., Gonthier, B., Signorini, N., Eysseric, H., & Barret, L. (2004). Impact of ethanol and acetaldehyde on DNA and cell viability of cultured neurones. *Cell biology and toxicology*, 20(6), 361–374. <https://doi.org/10.1007/s10565-004-0087-9>.
- Langeh, U., and Singh, S. (2021). Targeting S100B protein as a surrogate biomarker and its role in various neurological disorders. *Curr. Neuropharmacol.* 19 (2), 265–277. doi:10.2174/1570159X18666200729100427
- Larsen, B. D., and Sørensen, C. S. (2017). The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *FEBS J.* 284 (8), 1160–1170. doi:10.1111/febs.13970
- Latifkar, A, Hur, Y. H., Sanchez, J. C, Cerione, R. A, & Antonyak, M. A. (2019). New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. *Journal of cell science*, 132(13), jcs222406. <https://doi.org/10.1242/jcs.222406>.
- Lau, C. L., O., Shea, R. D., Broberg, B. V., Bischof, L., & Beart, P. M. (2011). The Rho kinase inhibitor Fasudil up-regulates astrocytic glutamate transport subsequent to actin remodelling in murine cultured

astrocytes. *British journal of pharmacology*, 163(3), 533–545. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01259.x>.

Lavialle, M., Aumann, G., Anlauf, E., Pröls, F., Arpin, M., & Derouiche, A. (2011). Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12915–12919. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100957108>

Lázaro-Ibáñez, E., Lässer, C., Shelke, G. V., Crescitelli, R., Jang, S. C., Cvjetkovic, A., et al. (2019). DNA analysis of low-and high-density fractions defines heterogeneous subpopulations of small extracellular vesicles based on their DNA cargo and topology. *J. Extracel. Ves.* 8 (1), 1656993. doi:10.1080/20013078.2019.1656993

Leng, K., Li, E., Eser, R., Piergies, A., Sit, R., Tan, M., Neff, N., Li, S. H., Rodriguez, R. D., Suemoto, C. K., Leite, R. E. P., Ehrenberg, A. J., Pasqualucci, C. A., Seeley, W. W., Spina, S., Heinsen, H., Grinberg, L. T., & Kampmann, M. (2021). Molecular characterization of selectively vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Nature neuroscience*, 24(2), 276–287. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00764-7>

Lindenboim L, Grozki D, Amsalem-Zafran AR, Peña-Blanco A, Gundersen GG, Borner C, Hodzic D, Garcia-Sáez AJ, Worman HJ, Stein R. Apoptotic stress induces Bax-dependent, caspase-independent redistribution of LINC complex nesprins. *Cell Death Discov.* 2020 Sep 18;6(1):90. doi: 10.1038/s41420-020-00327-6. PMID: 33024575; PMCID: PMC7501853.

Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(8), 1583. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>

Li, T., Tan X., Li, S., Al-Nusaif, M., & Le, W. (2021). Role of Glia-Derived Extracellular Vesicles in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13(October), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.765395>.

Li, Z. et al. (2014) 'Cyclin D1 Integrates Estrogen-Mediated DNA Damage Repair Signaling', *Cancer Research*, 74(14), pp. 3959–3970. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3137>.

Li, J., Zhao, H., McMahon, A., & Yan, S. (2022). APE1 assembles biomolecular condensates to promote the ATR-Chk1 DNA damage response in nucleolus. *Nucleic acids research*, 50(18), 10503–10525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac853>

Li, X., & Heyer, W. D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell research*, 18(1), 99–113.

Liddle, P., Jara-Wilde, J., Lafon-Hughes, L., Castro, I., Härtel, S., & Folle, G. (2020). dSTORM microscopy evidences in HeLa cells clustered and scattered γH2AX nanofoci sensitive to ATM, DNA-PK, and ATR kinase inhibitors. *Molecular and cellular biochemistry*, 473(1-2), 77–91. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03809-4>

Liddle, P., Lafon-Hughes, L., Di Tomaso, M.V., Reyes-Ábalos, A.L., Jara, J., Cerda, M., Härtel, S. & Folle, G.A. (2014). Bleomycin-induced γH2AX foci map preferentially to replicating domains in CHO9 interphase nuclei. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, 22(4), 463–481. <https://doi.org/10.1007/s10577-014-9433-9>.

Lindenboim, L., Borner, C., & Stein R. (2011). Nuclear proteins acting on mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(4), 584–596. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.016>.

- Lindenboim, L., Ferrando-May, E., Borner, C., & Stein, R. (2013). Non-canonical function of Bax in stress-induced nuclear protein redistribution. *Cellular and molecular life science: CMLS*, 70(16), 3013–3027. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1306-4>.
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Liu, L. R., Liu, J. C., Bao, J. S., Bai, Q. Q., & Wang, G. Q. (2020). Interaction of Microglia and Astrocytes in the Neurovascular Unit. *Frontiers in immunology*, 11, 1024. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01024>
- Lindahl T. (1993). Recovery of antediluvian DNA. *Nature*, 365(6448), 700. <https://doi.org/10.1038/365700a0>
- Latifkar A., Hur Y., Sanchez J. C., Cerione R. A., and Antonyak M. A., (2019) “New insights into extracellular vesicle biogenesis and function,” *Journal of Cell Science*, vol. 132, no. 13, article jcs222406.
- Little, J. B., Azzam, E. I., de Toledo, S. M., & Nagasawa, H. (2002). Bystander effects: intercellular transmission of radiation damage signals. *Radiation protection dosimetry*, 99(1-4), 159–162. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a006751>.
- Lu, J., Zheng, X., Li, F., Yu, Y., Chen, Z., Liu, Z., Wang, Z., Xu, H., & Yang, W. (2017). Tunneling nanotubes promote intercellular mitochondria transfer followed by increased invasiveness in bladder cancer cells. *Oncotarget*, 8(9), 15539–15552. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14695>.
- Ma, L., Li, Y., Peng, J., Wu, D., Zhao, X., Cui, Y., Chen, L., Yan, X., Du, Y., & Yu, L. (2015). Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell research*, 25(1), 24–38. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.135>.
- Madrigal, J. L., Olivenza, R., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Rodrigo, J., & Leza, J. C. (2001). Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 24(4), 420-429. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00208-6](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00208-6).
- Malaquin, N. et al. (2015) ‘DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment’, *Frontiers in Genetics*, 6(FEB), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00094>
- Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., and Aten, J. A. (1993). Measurement of colocalization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.* 169 (3), 375–382. doi: 10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x
- Makrygianni, E. A., & Chrousos, G. P. (2023). Extracellular Vesicles and the Stress System. *Neuroendocrinology*, 113(2), 120–167. <https://doi.org/10.1159/000527182>.
- Malenica, M., Vukomanović, M., Kurtjak, M., Masciotti, V., Dal Zilio, S., Greco, S., Lazzarino, M., Krušić, V., Perčić, M., Jelovica Badovinac, I., Wechtersbach, K., Vidović, I., Baričević, V., Valić, S., Lučin, P., Kojc, N., & Grabušić, K. (2021). Perspectives of Microscopy Methods for Morphology Characterisation of Extracellular Vesicles from Human Biofluids. *Biomedicines*, 9(6), 603. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060603>.
- Mende M. A. (2019). Alcohol in the Aging Brain - The Interplay Between Alcohol Consumption, Cognitive Decline and the Cardiovascular System. *Frontiers in neuroscience*, 13, 713. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00713>.

- Maly, I. V., Morales, M. J., & Pletnikov, M. V. (2021). Astrocyte Bioenergetics and Major Psychiatric Disorders. *Advances in neurobiology*, 26, 173-227. https://doi.org/10.1007/978-3-030-77375-5_9.
- Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J., & Kuma, R. (1998). Nuclear targeting of Bax during apoptosis in human colorectal cancer cells. *Oncogene*, 17(8), 999-1007. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202020>.
- Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D. (2006). Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature clinical practice. Neurology*, 2(12), 679–689. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0355>.
- Marti, T.M, Hefner, E, Feeney, L. & Cleaver J. (2006). H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *PNAS*, 103 (26) 9891-9896 <https://doi.org/10.1073/pnas.0603779103>.
- Matsumoto, M., Yaginuma, K., Igarashi, A., Imura, M., Hasegawa, M., Iwabuchi, K., Date, T., Mori, T., Ishizaki, K., Yamashita, K., Inobe, M., & Matsunaga, T. (2007). Perturbed gap-filling synthesis in nucleotide excision repair causes histone H2AX phosphorylation in human quiescent cells. *Journal of cell science*, 120(Pt 6), 1104–1112. <https://doi.org/10.1242/jcs.03391>.
- Meda, S. A., Hawkins, K. A., Dager, A. D., Tennen, H., Khadka, S., Austad, C. S., Wood, R. M., Raskin, S., Fallahi, C. R., & Pearson, G. D. (2018). Longitudinal Effects of Alcohol Consumption on the Hippocampus and Parahippocampus in College Students. *Biological psychiatry. Cognitive neuroscience and neuroimaging*, 3(7), 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2018.02.006>.
- McCrea, P. D., and Gottardi, C. J. (2016). Beyond β -catenin: prospects for a larger catenin network in the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 17 (1), 55–64. doi:10.1038/nrm.2015.3
- McMahon, C., Suthiphongchai, T., DiRenzo, J., and Ewen, M. E. (1999). P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *PNAS* 96 (10), 5382–5387. doi:10.1073/pnas.96.10.5382
- Merighi, A., Gionchiglia, N., Granato, A., and Lossi, L. (2021). The phosphorylated form of the histone H2AX (γ H2AX) in the brain from embryonic life to old age. *Mol. (Basel, Switz.* 26 (23), 7198. doi:10.3390/molecules26237198
- Mjelle, R., Hegre, S. A., Aas, P. A., Slupphaug, G., Drabløs, F., Sætrom, P., et al. (2015). Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes. *DNA repair* 30, 53–67. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.03.007
- Mohammadzadeh, A., Mirza-Aghazadeh-Attari, M., Hallaj, S., Saei, A. A., Alivand, M. R., Valizadeh, A., Yousefi, B., & Majidinia, M. (2019). Crosstalk between P53 and DNA damage response in ageing. *DNA repair*, 80, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.05.004>.
- Montoliu, C., Sancho-Tello, M., Azorin, I., Burgal, M., Vallés, S., Renau-Piqueras, J., & Guerri, C. (1995). Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *Journal of neurochemistry*, 65(6), 2561–2570. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65062561.x>.
- Mothersill, C., & Seymour, C. (2001). Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Radiation research*, 155(6), 759–767. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2001\)155\[0759:ribeph\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)155[0759:ribeph]2.0.co;2).
- Musgrove, E.A. (2006). Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation: mini review. *Growth factors*, 24(1), 13-19. <https://doi.org/10.1080/08977190500361812>.
- Minois, N. (2000) “Longevity and aging: beneficial effects of exposure to mild stress.,” *Biogerontology*, 1(1991), pp. 15–29.

- Mutlu-Türkoğlu, Ü., Doğru-Abbasoğlu, S., Aykaç-Toker, G., Mirsal, H., Beyazyürek, M., and Uysal, M. (2000). Increased lipid and protein oxidation and DNA damage in patients with chronic alcoholism. *J. Lab. Clin. Med.* 136 (4), 287–291. doi:10.1067/mlc. 2000.109097
- Myung, N. H., Zhu, X., Kruman, I. I., Castellani, R. J., Petersen, R. B., Siedlak, S. L., et al. (2008). Evidence of DNA damage in Alzheimer disease: phosphorylation of histone H2AX in astrocytes. *Age Dordr. Neth.* 30 (4), 209–215. doi:10.1007/s11357- 008-9050-7
- Nagasawa, H., & Little, J. B. (1992). Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer research*, 52(22), 6394–6396.
- Nakhle, J., Khattar, K., Özkan, T., Boughlita, A., Abba Moussa, D., Darlix, A., Lorcy, F., Rigau, V., Bauchet, L., Gerbal-Chaloin, S., Daujat-Chavanieu, M., Bellvert, F., Turchi, L., Virolle, T., Hugnot, J. P., Buisine, N., Galloni, M., Dardalhon, V., Rodriguez, A. M., & Vignais, M. L. (2023). Mitochondria Transfer from Mesenchymal Stem Cells Confers Chemoresistance to Glioblastoma Stem Cells through Metabolic Rewiring. *Cancer research communications*, 3(6), 1041–1056. <https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-23-0144>.
- Narciso, L. et al. (2016) 'The Response to Oxidative DNA Damage in Neurons: Mechanisms and Disease', *Neural Plasticity*, 2016, pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/3619274>.
- Natarajan, A. T., & Obe, G. (1984). Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. III. Restriction endonucleases. *Chromosoma*, 90(2), 120–127. <https://doi.org/10.1007/BF00292448>.
- Nowsheen, S., Aziz, K., Luo, K., Deng, M., Qin, B., Yuan, J., Jeganathan, K. B., Yu, J., Zhang, H., Ding, W., van Deursen, J. M., & Lou, Z. (2018). ZNF506-dependent positive feedback loop regulates H2AX signaling after DNA damage. *Nature communications*, 9(1), 2736. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05161-0>
- Niida, H. & Nakanishi, M., (2006). DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*, 21(1), 3–9. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei063>.
- Nunes, P. T., Kipp, B. T., Reitz, N. L., & Savage, L. M. (2019). Aging with alcohol-related brain damage: Critical brain circuits associated with cognitive dysfunction. *International review of neurobiology*, 148, 101–168. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2019.09.002>.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., & Weinert, T.A., (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annual review of genetics*, 36, 617–656. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet. 36.060402.113540>.
- Olivera, S., Fernandez, A., Latini, A., Rosillo, J. C., Casanova, G., Wajner, M., et al. (2008). Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiol. Dis.* 32 (3), 528–534. doi:10.1016/j.nbd.2008.09.011
- Olivera-Bravo, S., Fernández, A., Sarlabós, M. N., Rosillo, J. C., Casanova, G., Jiménez, M., & Barbeito, L. (2011). Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I. *PloS one*, 6(6), e20831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020831>.
- Olivera-Bravo, S., Ribeiro, C. A., Isasi, E., Trías, E., Leipnitz, G., Díaz-Amarilla, P., et al. (2015). Striatal neuronal death mediated by astrocytes from the Gcdh-/- mouse model of glutaric acidemia type I. *Hum. Mol. Gen.* 24 (16), 4504–4515. doi:10.1093/hmg/ddv175
- Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., Weil, S., Horstmann, H., Wiestler, B., Syed, M., Huang, L., Ratliff, M., Karimian Jazi, K., Kurz, F. T., Schmenger, T., Lemke, D., Gömmel, M., Pauli,

- M., Liao, Y., Häring, P., & Winkler, F. (2015). Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*, 528(7580), 93–98. <https://doi.org/10.1038/nature16071>.
- Ou, H. L., & Schumacher, B. (2018). DNA damage responses and p53 in the aging process. *Blood*, 131(5), 488–495. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-746396>.
- Park, M. S., Kim, C. S., Joo, H. K., Lee, Y. R., Kang, G., Kim, S. J., et al. (2013). Cytoplasmic localization and redox cysteine residue of APE1/Ref-1 are associated with its anti-inflammatory activity in cultured endothelial cells. *Mol. Cells* 36, 439–445. doi:10.1007/s10059-013-0195-6
- Pederson, T. (2011). The nucleolus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a000638. doi: 10.1101/cshperspect.a000638
- Peters A, Palay SL, de F Webster H (1991) The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells. Oxford University Press, New York
- Pegtel, D. M., Peferoen, L., and Amor, S. (2014). Extracellular vesicles as modulators of cell-to-cell communication in the healthy and diseased brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 369 (1652), 20130516. doi:10.1098/rstb.2013.0516
- Pellegrini, F., and Budman, D. R. (2005). Review: tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development. *Cancer Invest* 23 (3), 264–273. doi:10.1081/cnv-200055970
- Philimonenko, V. V., Zhao, J., Iben, S., Dingová, H., Kyselá, K., Kahle, M., et al. (2004). Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* 6 (12), 1165–1172. doi: 10.1038/ncb1190
- Pittenger, C., & Duman, R. S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(1), 88–109. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301574>
- Pittaras, E. et al. (2016) 'Individual behavioral and neurochemical markers of unadapted decision-making processes in healthy inbred mice', *Brain Structure and Function*, 221(9), pp. 4615–4629. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1192-2>.
- Pretorius, E., & Marx, J. (2004). Direct and indirect effects of corticosteroids on astrocyte function. *Reviews in the neurosciences*, 15(3), 199–207. <https://doi.org/10.1515/revneuro.2004.15.3.199>.
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*, 200(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>.
- Redon, C. E., Dickey, J. S., Bonner, W. M., & Sedelnikova, O. A. (2009). γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Advances in space research: the official journal of the Committee on Space Research (COSPAR)*, 43(8), 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2008.10.011>
- Reyes-Ábalos, A. L., Liddle, P., Folle, G. A., & Di Tomaso, M. V. (2018). γ H2AX prefers late replicating metaphase chromosome regions. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 836(Pt B), 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.06.001>.
- Reyes-Ábalos, A. L., Álvarez-Zabaleta, M., Olivera-Bravo, S., & Di Tomaso, M. V. (2024). Astrocyte DNA damage and response upon acute exposure to ethanol and corticosterone. *Frontiers in toxicology*, 5, 1277047. <https://doi.org/10.3389/ftox.2023.1277047>

- Reyes-Ábalos, A. L., Álvarez-Zabaleta, M., Olivera-Bravo, S., & Di Tomaso, M. V. (2024). Acute Genetic Damage Induced by Ethanol and Corticosterone Seems to Modulate Hippocampal Astrocyte Signaling. *International journal of cell biology*, 2024, 5524487. <https://doi.org/10.1155/2024/5524487>
- Riar, A. K., Narasimhan, M., Rathinam, M. L., Henderson, G. I., and Mahimainathan, L. (2016). Ethanol induces cytostasis of cortical basal progenitors. *J. Biomed. Sci.* 23, 6. doi:10.1186/s12929-016-0225-8
- Ridge, P. G., Mukherjee, S., Crane, P. K., Kauwe, J. S., & Alzheimer's Disease Genetics Consortium (2013). Alzheimer's disease: analyzing the missing heritability. *PloS one*, 8(11), e79771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079771>
- Rivier, C., Bruhn, T., and Vale, W. (1984). Effect of ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat: role of corticotropin-releasing factor (CRF). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229 (1), 127–131.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry*, 273(10), 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology*, 146(5), 905–916. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.905>
- Roos, W.P. & Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine*, 12(9), 440–450. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.007>.
- Rothkamm K, Horn S. gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita.* 2009;45(3):265-71. PMID: 19861731.
- Rubin, E., & Rottenberg, H. (1983). Ethanol and biological membranes: injury and adaptation. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 18 Suppl 1, 7–13. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(83\)90139-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(83)90139-9).
- Rulten, S. L., Hodder, E., Ripley, T. L., Stephens, D. N., and Mayne, L. V. (2008). Alcohol induces DNA damage and the Fanconi anemia D2 protein implicating FANCD2 in the DNA damage response pathways in brain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32 (7), 1186–1196. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00673.x
- Russo, A., Palumbo, M., Scifo, C., Cardile, V., Barcellona, M. L., & Renis, M. (2001). Ethanol-induced oxidative stress in rat astrocytes: role of HSP70. *Cell biology and toxicology*, 17(3), 153–168. <https://doi.org/10.1023/a:1011936313510>.
- Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., & Gerdes, H. H. (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5660), 1007–1010. <https://doi.org/10.1126/science.1093133>.
- Saez, A., and Gonzalez-Granado, J. M. (2022). Recent advances in intermediate filaments-volume 1. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (10), 5308. doi:10.3390/ijms23105308.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73 (1), 39–85. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723

- Sarrazin, N., Di Blasi, F., Roullot-Lacarrière, V., Rougé-Pont, F., Le Roux, A., Costet, P., Revest, J. M., & Piazza, P. V. (2009). Transcriptional effects of glucocorticoid receptors in the dentate gyrus increase anxiety-related behaviors. *PLoS one*, 4(11), e7704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007704>
- Šarc, L., and Lipnik-Štangelj, M. (2009). Comparison of ethanol and acetaldehyde toxicity in rat astrocytes in primary culture. *Arh. Hig. Rada. Toksiko.* 60 (3), 297–305. doi:10.2478/10004-1254-60-2009-1927
- Schneider M Fumagalli, F d'Adda di Fagagna (2012) Terminally differentiated astrocytes lack DNA damage response signaling and are radioresistant but retain DNA repair proficiency. *Cell Death and Differentiation* (2012) 19, 582–59.
- Shadfar, S., Brocardo, M., and Atkin, J. D. (2022). The complex mechanisms by which neurons die following DNA damage in neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (5), 2484. doi:10.3390/ijms23052484
- Shan, J., Zhao, W., and Gu, W. (2009). Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation. *Mol. Cell.* 36 (3), 469–476. doi: 10.1016/j.molcel.2009.10.018
- Shaw, A., & Gullerova, M. (2021). Home and Away: The Role of Non-Coding RNA in Intracellular and Intercellular DNA Damage Response. *Genes*, 12(10), 1475. <https://doi.org/10.3390/genes12101475>
- Schiffer, D., Cordera, S., Cavalla, P., & Migheli, A. (1996). Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 139 Suppl, 27–33. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(96\)00073-1](https://doi.org/10.1016/0022-510x(96)00073-1)
- Siddiqui, M.S. et al. (2015) 'Persistent γH2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging', *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 766, pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.07.001>.
- Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., & Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology*, 25, 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y. & Takeda, S. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair* 5, 1021–1029 (2006).
- Sonninen, T. M., Hämäläinen, R. H., Koskivi, M., Oksanen, M., Shakirzyanova, A., Wojciechowski, S., Puttonen, K., Naumenko, N., Goldsteins, G., Laham-Karam, N., Lehtonen, M., Tavi, P., Koistinaho, J., & Lehtonen, Š. (2020). Metabolic alterations in Parkinson's disease astrocytes. *Scientific reports*, 10(1), 14474. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71329-8>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>.
- Sofroniew, M.V. (2020). Astrocyte reactivity: subtypes, states, and functions in CNS innate immunity. *Trends in immunology*, 41(9), 758–770. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.004>.
- Stoklund Dittlau K and Van Den Bosch L (2023), Why should we care about astrocytes in a motor neuron disease? *Front. Mol. Med.* 3:1047540. doi: 10.3389/fmmed.2023.1047540
- Stanisic, V., Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2010). Modulation of steroid hormone receptor activity. *Progress in brain research*, 181, 153–176. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81009-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81009-6)
- Sun, D. and Jakobs, T.C. (2012) 'Structural Remodeling of Astrocytes in the Injured CNS', *The Neuroscientist*, 18(6), pp. 567–588. Available at: <https://doi.org/10.1177/1073858411423441>.

Sun, X., Wang, Y., Zhang J., Tu, J., Wang, X-J, Su, X-D, Wang, L, & Zhang, Y (2012) Tunneling-nanotube direction determination in neurons and astrocytes. *Cell Death and Disease*, 3, e438; doi:10.1038/cddis.2012.177.

Sun M., Xue X., Li L. et al. (2021), "Ectosome biogenesis and release processes observed by using live-cell dynamic imaging in mammalian glial cells," *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, vol. 11, no. 11, pp. 4604–4616.

Sun, X.L. et al. (2016) 'Gas1 up-regulation is inducible and contributes to cell apoptosis in reactive astrocytes in the substantia nigra of LPS and MPTP models', *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0643-2>.

Sundberg, M., Savola, S., Hienola, A., Korhonen, L., and Lindholm, D. (2006). Glucocorticoid hormones decrease proliferation of embryonic neural stem cells through ubiquitin-mediated degradation of cyclin D1. *J. Neurosci.* 26 (20), 5402–5410. doi:10.1523/JNEUROSCI.4906-05.2006

Suman, S. et al. (2016) 'AC SC'. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2016.06.003>.

Swain, U., & Subba Rao, K. (2011). Study of DNA damage via the comet assay and base excision repair activities in rat brain neurons and astrocytes during aging. *Mechanisms of ageing and development*, 132(8-9), 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2011.04.012>

Tan, L., and Yammani, R. R. (2022). Co-Immunoprecipitation-Blotting: analysis of protein-protein interactions. *Meth. Mol. Biol. Clift. N.J.*) 2413, 145–154. doi:10.1007/978-1-0716-1896-7_15

Taylor, A.R. et al. (2007) 'Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: Role of signaling kinases', *Developmental Neurobiology*, 67(13), pp. 1815–1829. Available at: <https://doi.org/10.1002/dneu.20559>.

Théry C., Witwer K. W., Aikawa E. (2018), "Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines," *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 7, article 1535750, 2018.

Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, 164(6), 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>.

Tchakarska, G., and Sola, B. (2020). The double dealing of cyclin D1. *Cell Cycle* 19 (2), 163–178. doi:10.1080/15384101.2019.1706903

Tosolini, D., Antoniali, G., Dalla, E., and Tell, G. (2020). Role of phase partitioning in coordinating DNA damage response: focus on the Apurinic Apyrimidinic Endonuclease 1 interactome. *Biomol. Con.* 11 (1), 209–220. doi:10.1515/bmc-2020-0019

Treviño, L. S., & Gorelick, D. A. (2021). The Interface of Nuclear and Membrane Steroid Signaling. *Endocrinology*, 162(8), bqab107. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqab107>

Upadhyay, R., Zingg, W., Shetty, S., & Shetty, A. K. (2020). Astrocyte-derived extracellular vesicles: Neuroreparative properties and role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 323, 225–239. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.017>.

Urbanelli, L., Magini, A., Buratta, S., Brozzi, A., Sagini, K., Polchi, A., Tancini, B., & Emiliani, C. (2013). Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes*, 4(2), 152–170. <https://doi.org/10.3390/genes4020152>

Valdebenito, S., Malik, S., Luu, R., Loudig, O., Mitchell, M., Okafo, G., Bhat, K., Prideaux, B., & Eugenin, E. A. (2021). Tunneling nanotubes, TNT, communicate glioblastoma with surrounding non-tumor astrocytes to

adapt them to hypoxic and metabolic tumor conditions. *Scientific reports*, 11(1), 14556. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93775-8>.

Valdebenito, S., D'Amico, D., & Eugenin, E. (2019). Novel approaches for glioblastoma treatment: Focus on tumor heterogeneity, treatment resistance, and computational tools. *Cancer reports (Hoboken, N.J.)*, 2(6), e1220. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1220>.

Vallés, S. L., Blanco, A. M., Pascual, M., and Guerri, C. (2004). Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol.* 14 (4), 365–371. doi:10.1111/j.1750-3639.2004.tb00079.x

Van der Mierden, S., Leenaars, C. H. C., Boyle, E. C., Ripoli, F. L., Gass, P., Durst, M., Goerlich-Jansson, V. C., Jirkof, P., Keubler, L. M., Talbot, S. R., Habedank, A., Lewejohann, L., Tolba, R. H., & Bleich, A. (2021). Measuring endogenous corticosterone in laboratory mice - a mapping review, meta-analysis, and open source database. *ALTEX*, 38(1), 111–122. <https://doi.org/10.14573/altex.2004221>

Van der Pol E., Böing A. N., Harrison P., Sturk A., and Nieuwland R., (2012) “Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles,” *Pharmacological Reviews*, vol. 64, no. 3, pp. 676–705.

Van Loon, B., Markkanen, E., & Hübscher, U. (2010). Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA repair*, 9(6), 604–616. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.03.004>

Verma, N., & Tiku, A. B. (2017). Significance and nature of bystander responses induced by various agents. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 773, 104–121. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.003>.

Verkhatsky, A., Parpura, V., Li, B., and Scuderi, C. (2021). Astrocytes: the housekeepers and guardians of the CNS. *Adv. Neurobiol.* 26, 21–53. doi:10.1007/978-3-030-77375-5_2

Verkhatsky, A., and Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiol. Rev.* 98 (1), 239–389. doi:10.1152/physrev.00042.2016

Van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.

Vardjan, N., Parpura, V., Verkhatsky, A., & Zorec, R. (2019). Gliocrine System: Astroglia as Secretory Cells of the CNS. *Advances in experimental medicine and biology*, 1175, 93–115. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_4

Vardjan, N., Parpura, V., Verkhatsky, A., & Zorec, R. (2019). Gliocrine System: Astroglia as Secretory Cells of the CNS. *Advances in experimental medicine and biology*, 1175, 93–115. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_4

Verkhatsky, A., Parpura, V., Vardjan, N., & Zorec, R. (2019). Physiology of AAstroglia. *Advances in experimental medicine and biology*, 1175, 45–91. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8-3>.

Wallensten, J., Nager, A., Åsberg, M., Borg, K., Beser, A., Wilczek, A., & Mobarrez, F. (2021). Leakage of astrocyte-derived extracellular vesicles in stress-induced exhaustion disorder: a cross-sectional study. *Scientific reports*, 11(1), 2009. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81453-8>.

Wang, Y., Cui, J., Sun, X., & Zhang, Y. (2011). Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell death and differentiation*, 18(4), 732–742. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.147>.

Ward, I. M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATRdependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* 276 (51), 47759–47762. doi:10.1074/jbc.C100569200

Waters, T.R. et al. (1999) Human Thymine DNA Glycosylase Binds to Apurinic Sites in DNA but Is Displaced by Human Apurinic Endonuclease 1*. Available at: <http://www.jbc.org/>.

Watson, C. S., Alyea, R. A., Cunningham, K. A., & Jeng, Y. J. (2010). Estrogens of multiple classes and their role in mental health disease mechanisms. *International journal of women's health*, 2, 153–166. <https://doi.org/10.2147/ijwh.s6907>

Weeks, S. E., Metge, B. J., and Samant, R. S. (2019). The nucleolus: a central response hub for the stressors that drive cancer progression. *Cell. Mol. Life Sci.* 76 (22), 4511–4524. doi:10.1007/s00018-019-03231-0

Weissman, L., de Souza-Pinto, N. C., Stevnsner, T., & Bohr, V. A. (2007). DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. *Neuroscience*, 145(4),1318–1329<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.061>

World Health Organization (2022). Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/alcohol> (Accessed July 15, 2023).

World Health Organization (2015) Health in 2015: from MDGs, Millennium Development Goals to SDGs, Sustainable Development Goals

Yuan, J., Adamski, R., & Chen, J. (2010). Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. *FEBS letters*, 584(17), 3717–3724. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.021>

Yamamoto A, Nakamura Y, Kobayashi N et al (2007) Neurons and astrocytes exhibit lower activities of global genome nucleotide excision repair than do fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* 6:649–657. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.12.006>

Yan, S., Sorrell, M. & Berman, Z. (2014). Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 71(20), 3951–3967. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1666-4>.

Yang, K., Liu, Y., & Zhang, M. (2024). The Diverse Roles of Reactive Astrocytes in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain sciences*, 14(2), 158. <https://doi.org/10.3390/brainsci14020158>

Yang, W., Singla, R., Maheshwari, O., Fontaine, C. J., & Gil-Mohapel, J. (2022). Alcohol Use Disorder: Neurobiology and Therapeutics. *Biomedicines*, 10(5), 1192. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051192>

Yang, Z., and Wang, K. K. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *TINS* 38 (6), 364–374. doi:10.1016/j.tins.2015.04.003

Yang, J.L. et al. (2010) ‘Neurons efficiently repair glutamate-induced oxidative DNA damage by a process involving CREB-mediated up-regulation of apurinic endonuclease 1’, *Journal of Biological Chemistry*, 285(36), pp. 28191–28199. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082883>.

Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., & De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*, 4, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>.

Yue, H., Zhang, M., Xing, L., Wang, K., Rao, X., Liu, H., Tian, J., Zhou, P., Deng, Y., & Shang, J. (2020). The epidemiology and clinical characteristics of co-infection of SARS-CoV-2 and influenza viruses in patients

during COVID-19 outbreak. *Journal of medical virology*, 92(11), 2870–2873.
<https://doi.org/10.1002/jmv.26163>

Yuan, J., Adamski, R. and Chen, J. (2010) 'Focus on histone variant H2AX: To be or not to be', *FEBS Letters*, 584(17), pp. 3717–3724. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.021>.

Yu, S., Yang, S., Holsboer, F., Sousa, N., & Almeida, O. F. (2011). Glucocorticoid regulation of astrocytic fate and function. *PloS one*, 6(7), e22419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022419>.

Zakhari, S. (2006). Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res. Health*. 29 (4), 245–254.

Zhao, S., Sheng, S., Wang, Y., Ding, L., Xu, X., Xia, X., & Zheng, J. C. (2021). Astrocyte-derived extracellular vesicles: A double-edged sword in central nervous system disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 125, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.02.027>.

Zhong, Z., Yeow, W. S., Zou, C., Wassell, R., Wang, C., Pestell, R. G., et al. (2010). Cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 interacts with filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells. *Cancer Res*. 70 (5), 2105–2114. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1108

Zimmer, T. S., Orr, A. L., & Orr, A. G. (2024). Astrocytes in selective vulnerability to neurodegenerative disease. *Trends in neurosciences*, 47(4), 289–302. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2024.02.008>

Zhu, Z-H, Yang, R., Fu, X, Wang, Y-Q., & Wu G-Ch, (2006). Astrocyte-conditioned medium protecting hippocampal neurons in primary cultures against corticosterone-induced damages via PI3-K/Akt signal pathway. *Brain Research*, 1114, (1-10), ISSN 0006-8993, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.07.070>.