

Tesis de Doctorado

PEDECIBA - Área Biología

Efecto de la modulación metabólica mitocondrial en el fenotipo de las células gliales: implicancias para la Esclerosis Lateral Amiotrófica

Laura Martínez Palma

Orientadora: Dra. Patricia Cassina
Departamento de Histología y Embriología
Facultad de Medicina, Universidad de la República

Co-orientadora: Dra. Adriana Cassina
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, Universidad de la República

Comisión de Asesoramiento y Seguimiento: Dra. Mónica Brauer
Dra. Celia Quijano
Dra. Silvia Olivera

Tribunal: Dra. Silvia Olivera
Dra. Laura Castro
Dra. Patricia Lagos

Agradecimientos

Agradezco:

A Patricia Cassina y Adriana Cassina, orientadoras, jefas y amigas, por estar siempre ahí

A las integrantes de la Comisión de Asesoramiento y Seguimiento, Mónica Brauer, Celia Quijano y Silvia Olivera, por toda la ayuda y los aportes.

A las integrantes del Tribunal, Silvia Olivera, Laura Castro y Patricia Lagos, por aceptar corregir esta tesis y sus valiosos aportes

A todos los compañeros del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina que de una u otra forma ayudaron para que este trabajo llegara a su fin!

A Tenemos ELA Uruguay por todo lo que hacen/mos para que se conozca la ELA y mejorar la calidad de vida de los pacientes

A los compañeros del CELAU, por las charlas y aprendizajes, y por atender a los pacientes como lo hacen

A los pacientes que concurren al CELAU, por prestarse a colaborar con nosotros...

Dedico y agradezco:

A mi mamá y todos los pacientes con ELA

A mi papá y mis hermanos,

A las familias de los pacientes, a los que cuidan y están ahí

A Gabriel y Martín porque son lo más

Índice

Listado de Abreviaturas	6
Resumen	9
Introducción y antecedentes	11
1 . Neurodegeneración y Esclerosis Lateral Amiotrófica	11
1.1 - Neurodegeneración	11
1.2 - Enfermedades neurodegenerativas	11
1.3 - Neuroinflamación	11
1.4 - Esclerosis Lateral Amiotrófica	12
1.4.1 - Diagnóstico de la ELA	12
1.4.2 - La ELA es heterogénea	13
1.4.3 - Características clínicas de la ELA	13
1.4.4 - Alteraciones genéticas en la ELA	14
1.4.5 - Modelos de investigación en ELA	15
1.4.6 - Mecanismos patogénicos en la ELA y tratamientos específicos	16
2. Rol de las mitocondrias en la ELA	17
2.1 - Mitocondrias	17
2.1.1. - Estructura interna de las mitocondrias	17
2.1.2. - Morfología externa de las mitocondrias	20
2.1.3. - Función bioenergética mitocondrial	21
2.1.4. - Flujo de electrones	22
2.2 - Alteraciones mitocondriales en la ELA	23
3. Glía y neuroinflamación en la ELA	24
3.1 - Células gliales	24
3.1.1. - Astrocitos	25
3.1.2. - Microglía	25
3.2 - Marcadores fenotípicos de las células gliales	26
3.3 - Respuesta de las células gliales al daño y la degeneración	27
3.3.1. - Activación de los astrocitos	27
3.3.1. - Activación de la microglía	27
3.4 - Neuroinflamación en la ELA	28
3.4.1. - Los astrocitos	28
3.4.2. - La microglía	29
3.4.3. - Células gliales aberrantes	29
3.5 - Metabolismo y función mitocondrial de la glia y su rol en la ELA	30

3.5.1. - Función bioenergética de los astrocitos y acoplamiento metabólico glía-neurona	30
3.5.2. - Actividad bioenergética de la microglía	31
4. Antecedentes específicos y dicloroacetato	31
5. ¿Existen células gliales aberrantes en los pacientes con ELA?	33
Hipótesis y objetivos	35
Estrategia de investigación y actividades específicas	36
Materiales y métodos	37
Materiales	37
Animales	38
Pacientes	39
Cultivos celulares	40
Tratamiento de cultivos y preparación de medio condicionado	42
Inmunofluorescencia en cultivos	42
Tratamiento de motoneuronas y estudio de supervivencia	43
Estudio de la morfología mitocondrial	43
Estudio de la función mitocondrial	45
Estudio del crecimiento y la proliferación celular	46
Medida de la concentración de lactato y glucosa	46
Administración de DCA a los animales y estudios de inmunofluorescencia en la médula espinal	47
Presentación de resultados y análisis de datos	48
Resultados	49
La función respiratoria y la longitud mitocondrial son menores en las células gliales portadoras de la SOD1G93A	49
La modulación metabólica con DCA mejoró la respiración mitocondrial en las células gliales aberrantes y disminuyó el lactato extracelular	51
La modulación metabólica con DCA redujo el crecimiento y proliferación de las células aberrantes	53
La modulación metabólica con DCA redujo la toxicidad de las células gliales aberrantes	55
Evaluación de células gliales aberrantes, neuroinflamación y neurodegeneración en ratas SOD1G93A	57
Identificación de glías aberrantes en individuos portadores de ELA	60
Red mitocondrial en las células de pacientes con ELA	65
Discusión	68

Perspectivas	80
Otras actividades durante el desarrollo de esta tesis	80
Trabajo publicado de la tesis	82
Referencias bibliográficas	83



Listado de abreviaturas

AA - antimicina A
AbGCs - células gliales aberrantes
ALSFRS-R - (Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale - Revised) Escala revisada de Valoración Funcional de la Esclerosis Lateral Amiotrófica
ATP - adenosín 5´-trifosfato
BHE - barrera hematoencefálica
BrDU - bromodeoxiuridina
BSA - albúmina sérica bovina
CELAU - Centro de ELA del Uruguay
CF - microscopía de contraste de fase
CJ - Crista junctions
CK - Ciclo de Krebs
CRes - Capacidad respiratoria de reserva
CRM - cadena respiratoria mitocondrial
Cx-43 - Connexin 43
DCA - dicloroacetato
DFT - Demencia frontotemporal
DIV - días in vitro
DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO - dimetil-sulfóxido
DPBS - buffer fosfato salino Dulbecco
EAA - aminoácidos excitatorios
EIM - Espacio intermembrana
ELA - Esclerosis Lateral Amiotrófica
ELAe - Esclerosis Lateral Amiotrófica esporádica
ELAf - Esclerosis Lateral Amiotrófica familiar
EMN - Enfermedad de la motoneurona
END - Enfermedades neurodegenerativas
FADH2 - flavina adenina dinucleótido
FBS - suero fetal bovino
FCCP - carbonyl cyanide p- trifluoromethoxyphenylhydrazone
FDA - Food and Drug Administration
FGF-1 - factor de crecimiento fibroblástico 1
FL - feeder layers
FP - fuga de protones

GDNF - factor neurotrófico derivado de células gliales
GFAP - Proteína Ácida Glial Fibrilar (Glial fibrillary acidic protein)
GLT-1 - glutamate transporter 1
GS - glutamina sintasa
GSTZ1 - glutatión transferasa zeta1
GWAS: genome-wide association study o WGAS: whole genome association study - estudios de asociación del genoma completo
HO-1 - hemoxigenasa-1
HRR - respirometría de alta resolución
INDT - Instituto Nacional de Donación y Trasplante de Células, Tejidos y Órganos
iPSC - Células madre pluripotentes inducidas
LCR - líquido cefalorraquídeo
LPS - lipopolisacárido bacteriano
MFF - mitochondrial fission factor
MICOS - mitochondrial contact site and cristae organizing system
MME - Membrana mitocondrial externa
MMI - Membrana mitocondrial interna
MMIC - Membrana mitocondrial interna crestas
MMID - Membrana mitocondrial interna delimitante de la matriz
MNI - Motoneuronas inferiores
MNS - Motoneuronas superiores
mtADN - ADN mitocondrial
NADH - nicotinamida adenina dinucleótido
NG2: NG2 chondroitin sulfate proteoglycan;
nTg - no transgénicos
OCR - oxygen consumption rate
PCR - reacción en cadena de la polimerasa
PDHC - complejo piruvato deshidrogenasa
PDK - piruvato deshidrogenasa quinasa
PFA - paraformaldehído
PL - Punción lumbar
pmf - fuerza protón-motriz
RCR - índice de control respiratorio
RCR - Índice de control respiratorio celular
RMax - Respiración mitocondrial máxima
SC - supercomplejos
SN - Sistema nervioso

s-NB - medio Neurobasal suplementado

SNC - Sistema Nervioso Central

SOD1 - Superóxido Dismutasa 1

SOD1G93A - animales transgénicos portadores de la SOD1 humana con mutación puntual de una glicina por una alanina en el sitio 93

VDAC1 - canal aniónico dependiente de voltaje 1

Resumen

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa fatal, que involucra a las motoneuronas superiores de la corteza cerebral y las inferiores del tronco encefálico y la médula espinal. Provoca parálisis progresiva y otras alteraciones dependientes de la afectación de los músculos esqueléticos voluntarios. Aunque se han reportado mutaciones causales, en la mayoría de los casos la etiología es desconocida. Los factores involucrados en su patogenia son múltiples y gran parte de ellos se relacionan directa o indirectamente a alteraciones de la función mitocondrial. Uno de los modelos experimentales utilizados para el estudio de la ELA son los roedores transgénicos para la proteína superóxido dismutasa 1 humana con la mutación G93A (SOD1G93A) asociada a casos familiares de la enfermedad. La neurodegeneración en la ELA se acompaña de un proceso neuroinflamatorio que involucra una gliosis reactiva con cambios fenotípicos en astrocitos y microglía y la aparición de células gliales aberrantes (AbGCs) descritas recientemente en el modelo de la rata SOD1G93A. El fenotipo neurotóxico en astrocitos de los modelos de ELA, se asocia a una reducida respiración mitocondrial en cultivo. La modulación de la actividad mitocondrial es capaz de reducir la proliferación y neurotoxicidad de los astrocitos en cultivo y la gliosis en la médula espinal. Las AbGCs en cultivo tienen mucho mayor toxicidad para motoneuronas que la observada en los astrocitos, y además de presentar una altísima actividad proliferativa, carecen de inhibición por contacto y de senescencia replicativa. En la médula espinal de las ratas SOD1G93A se identifican como células hipertróficas doble-marcadas para GFAP y S100 β , y su aparición y número se correlaciona con la progresión de la patología. Nuestra hipótesis a partir de estos antecedentes fue que la actividad mitocondrial juega un rol preponderante en la determinación del fenotipo neurotóxico-inflamatorio de las AbGCs. Utilizando células en cultivo, analizamos la morfología mitocondrial mediante microscopía confocal luego de su incubación con sondas fluorescentes específicas, y observamos que las AbGCs presentan mitocondrias más pequeñas que los astrocitos espinales de animales transgénicos neonatales y aún menor que la de los salvajes. Mediante respirometría de alta resolución observamos una correlación positiva de la función mitocondrial expresada como el índice de control respiratorio (RCR) con la longitud de las mitocondrias. El tratamiento con el modulador metabólico dicloroacetato (DCA), mejoró el RCR y otros parámetros respiratorios funcionales de las AbGCs en cultivo, disminuyó su proliferación y su toxicidad para con las motoneuronas espinales. En estudios *in vivo*, en las ratas SOD1G93A tratadas con DCA luego de iniciadas las alteraciones motoras, se constató una disminución de la gliosis en la médula espinal lumbar, dada por una menor inmunoreactividad para GFAP e Iba1, marcadores de astrocitos y microglía respectivamente, y del número de células gliales hipertróficas doble-marcadas para GFAP y S100 β . Esto se acompañó de una disminución de la pérdida de las motoneuronas, como se evidencia por un mayor número y diámetro promedio en comparación con los animales tratados con vehículo. Junto con nuestros resultados previos sobre los efectos beneficiosos del DCA en el desempeño motor y la supervivencia de los ratones con SOD1G93A, estos hallazgos destacan la posibilidad de que el DCA pueda tener utilidad terapéutica en pacientes con ELA.

En otro capítulo de la tesis, nos preguntamos si células tipo AbGCs podrían estar presentes en los

pacientes con ELA. Dada su alta actividad proliferativa, su carencia de inhibición por contacto y de senescencia replicativa, en conjunto con algunos aspectos ultraestructurales, las AbGCs tienen semejanzas con las células tumorales. Por otro lado, las células de tumores primarios o metastásicos del sistema nervioso central pueden encontrarse en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes. Nuestra hipótesis en esta parte del trabajo fue que el LCR puede ser una fuente de células aberrantes o reactivas similares a las identificadas en el modelo animal en los individuos afectados por la ELA. Nuestros resultados son preliminares, pero pudimos obtener cultivos celulares a partir del LCR de 2 pacientes y un control en los que estudiamos la expresión de marcadores gliales por inmunofluorescencia. Para uno de los pacientes, pudimos expandir las células hasta el pasaje 5, criopreservarlas y descongelar una muestra. En un pasaje 9 de éstas, mediante sondas fluorescentes y microscopía confocal, observamos una red mitocondrial extensa que puede modularse con DCA. Esta parte del trabajo revela la posibilidad de obtener células del LCR de los pacientes para el estudio de mecanismos de la enfermedad, para la evaluación del genotipo y fenotipo como biomarcadores, y el ensayo de tratamientos.

Introducción y antecedentes

1. Neurodegeneración y Esclerosis Lateral Amiotrófica

1.1 – Neurodegeneración

El sistema nervioso (SN) tiene una organización compleja donde se integran las neuronas, las células gliales y otros tipos celulares que incluyen las que forman parte de las meninges y los elementos vasculares. Las neuronas son las células principales de las que dependen las funciones del SN, incluyendo la regulación del medio interno, la comunicación con el medio externo, y son también responsables de las funciones superiores del ser humano como la conciencia, el pensamiento, el aprendizaje y la memoria que son la base del comportamiento cognitivo.

A diferencia de las células principales de otros sistemas, la mayoría de las neuronas son células diferenciadas que no se renuevan, y que no son reemplazadas si mueren luego de un daño. La **neurodegeneración** es un proceso que conduce a la disfunción y muerte neuronal en forma progresiva con la consiguiente alteración funcional (Jellinger, 2010; G. G. Kovacs, 2016; Ransohoff, 2016b).

1.2 - Enfermedades neurodegenerativas (END)

Las END constituyen un conjunto de patologías definidas por la pérdida de neuronas (neurodegeneración) progresiva e irreversible, que afecta a un grupo particular de neuronas en el sistema nervioso central (SNC), cuyas manifestaciones clínicas (motoras, cognitivas, etc.) varían de acuerdo con la función cerebral específica del grupo neuronal comprometido (Jellinger, 2010; Lewis & Spillane, 2019a). Su patogenia es multifactorial, e incluye variables genéticas, ambientales o endógenas, generalmente relacionadas al envejecimiento (Bossy-Wetze, Schwarzenbacher, & Lipton, 2004; Jellinger, 2010; Kritsilis et al., 2018). Las END tienen varios mecanismos básicos comunes, que incluyen estrés oxidativo, alteraciones en la homeostasis de proteínas o ARN, en la función mitocondrial y estado bioenergético, y en otros organelos como el complejo de Golgi o el retículo endoplásmico (Barker, 2016; Jellinger, 2010; G. G. Kovacs, 2016).

1.3 - Neuroinflamación

Otro aspecto común a las END es que **no son dependientes de la alteración de un solo tipo celular**, sino que la afectación neuronal se acompaña de cambios neuroinflamatorios dependientes de otros tipos celulares. El proceso de **neuroinflamación** se caracteriza por el aumento en la producción de mediadores inflamatorios como citoquinas y otros factores con

actividad neurotrófica o neurotóxica. El proceso involucra fundamentalmente a las células gliales residentes activadas y además a las células vasculares - endoteliales, musculares lisas y pericitos - así como a células inmunes periféricas incluyendo macrófagos, neutrófilos y linfocitos que infiltran el SNC al estar comprometida la barrera hematoencefálica, o que se acumulan a nivel vascular o perivascular en los vasos sanguíneos cerebrales (Masgrau, Guaza, Ransohoff, & Galea, 2017; Ransohoff, 2016b; Stephenson, Nutma, van der Valk, & Amor, 2018). La neuroinflamación sería responsable también de otra característica de las END que es su **carácter progresivo** (Gao & Hong, 2008).

1.4 - Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

La ELA es una END en la que las neuronas afectadas son las motoneuronas (MNs), tanto las superiores cuyos somas se ubican en la corteza cerebral (MNS) como las inferiores, localizadas en el tronco encefálico y la médula espinal (MNI). Es fatal, conduciendo a la muerte en un período promedio de 2 a 5 años luego del diagnóstico (Fearon, Murray, & Mitsumoto, 2016). Es la enfermedad de la motoneurona (EMN) más frecuente. La incidencia anual global es de 1,2 a 2/100.000 habitantes, y la prevalencia aproximada es de 6/100.000 habitantes (Fearon et al., 2016; Talbott, Malek, & Lacomis, 2016). En Uruguay se encontró una incidencia anual de 1,42/100.000 hab. y una prevalencia de 2,01/100.000 habitantes (Vázquez et al., 2008), lo que hace que en nuestro país tengamos aproximadamente unos 50 casos nuevos por año.

La ELA constituye un problema importante de salud por su característica devastadora, la limitada esperanza de vida, la gravedad de las complicaciones, la invalidez progresiva que requiere de cuidados permanentes y cambiantes, ayudas técnicas que deben irse adaptando según la etapa, y diversos problemas que alteran la dinámica y estructura familiar. La discapacidad y dependencia severa provocada por la enfermedad tiene un importante impacto socioeconómico, con gastos directos en salud (medicación y otras terapias, equipamiento), cuidados, adaptaciones o reformas en el hogar, además de indirectos por pérdida de productividad del paciente y familia dedicada al cuidado (Gladman & Zinman, 2015).

1.4.1- El diagnóstico de la ELA es fundamentalmente clínico, apoyado en el estudio electrofisiológico; tiene en cuenta la presencia de signos (clínicos y electrofisiológicos) de afectación de MNS y MNI, su propagación a regiones contiguas al sitio de inicio en la evolución y la exclusión de otras patologías mediante estudios electrofisiológicos, patológicos o imagenológicos. Dependiendo de cuántos territorios están afectados en el momento del diagnóstico se establecen categorías pudiendo conformar una ELA posible,

probable o definida. Los criterios diagnósticos surgen en 1990 en una reunión del Subcomité de EMN/ELA de la Federación Mundial de Neurología en El Escorial (España), y fueron reevaluados en posteriores encuentros en Airlie House (EEUU) y Awaji Island (Japón) con la finalidad de uniformizar y facilitar el diagnóstico, tanto para el abordaje clínico como de investigación (Brooks, 1994; Brooks, Miller, Swash, & Munsat, 2000; de Carvalho et al., 2008; R. G. Miller, Munsat, Swash, & Brooks, 1999). Estos criterios han sido continuamente revisados intentando disminuir la demora diagnóstica, investigar su sensibilidad o últimamente incorporar elementos de más reciente descubrimiento (Agosta et al., 2015; Costa, Swash, & de Carvalho, 2012; Johnsen et al., 2019; Rutter-Locher, Turner, Leigh, & Al-Chalabi, 2016; van den Berg et al., 2019). La demora diagnóstica -entre 6 y 18 meses- es multicausal, y en ella influyen factores como la heterogeneidad de presentación, posibles diagnósticos diferenciales, comorbilidades, la falta de tests diagnósticos específicos y sensibles, y el hecho de que los médicos no neurólogos no están familiarizados con la ELA por su baja incidencia (Cellura, Spataro, Taiello, & La Bella, 2012; Iwasaki, Ikeda, & Kinoshita, 2001; Paganoni et al., 2014; Palese, Sartori, Logroscino, & Pisa, 2019; Zoccolella et al., 2006).

1.4.2- La ELA es heterogénea en cuanto a su forma de presentación, la edad a la que aparece, la región afectada al inicio, la expresión de síntomas y signos parciales, la velocidad evolutiva, la presencia de antecedentes familiares (ELA familiar, ELAf, 5 a 10% de los casos) o la ausencia de ellos (ELA esporádica, ELAe, 90% de los casos) (R. H. Brown & Al-Chalabi, 2017; Lewis & Spillane, 2019b; van Es et al., 2017).

1.4.3- Las características clínicas de la ELA traducen la afectación del control de los músculos esqueléticos voluntarios provocada por la degeneración de las MNs. Se manifiesta con síntomas y signos clínicos diversos, que incluyen pérdida de fuerza y finalmente parálisis de los miembros, tronco, cabeza y cuello. Se presenta disartria y dificultad en la comunicación, disfagia y compromiso nutricional, además de alteraciones en la ventilación por atrofia de los músculos respiratorios. La enfermedad, generalmente por insuficiencia respiratoria o sus complicaciones (Fearon et al., 2016).

Aunque clásicamente se plantea como una enfermedad sin afectación de las funciones superiores, con cierta frecuencia se encuentran alteraciones cognitivas o comportamentales, o se asocia a demencia frontotemporal (DFT), configurando el síndrome ELA-demencia, planteándose a la ELA y la DFT como los extremos de un espectro continuo de una misma enfermedad (Fearon et al., 2016; Ji, Zhang, Chen, & Huang, 2017; Lewis & Spillane, 2019b; Strong et al., 2017; van Es et al., 2017). La evidencia actual muestra que los déficits neuropsicológicos en la ELA son también heterogéneos, y afectan cerca del 50% de los casos, y cuando están presentes son de mal pronóstico para la supervivencia (Strong et al.,

2017). La conexión ELA-DFT ha ganado mayor aceptación a partir del gran avance en la genética ocurrido los últimos años.

1.4.4- Alteraciones genéticas en la ELA

Un importante hallazgo fue la identificación en 2011 de una expansión anormal del hexanucleótido GGGGCC en primer intrón del gen C9orf72 codificante de una proteína de función desconocida en ese momento, como la causa más común de ELA y DFT (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). La proteína C9orf72 se ha identificado recientemente como un intercambiador de nucleótidos de guanina regulador de Rab GTPasas (Iyer, Subramanian, & Acharya, 2018), y los mecanismos propuestos para los cambios neurodegenerativos inducidos por las expansiones intrónicas incluyen la pérdida de función de C9orf72 por haploinsuficiencia, o ganancia de funciones tóxicas sobre el ARN o por acumulación de proteínas de dipéptidos repetidos tóxicos. Ello genera afectación de múltiples procesos celulares, incluido el transporte nucleocitoplasmático, el procesamiento de ARN, la función del nucleolo, la formación de orgánulos no membranosos, la traducción, el sistema ubiquitina-proteasoma, el transporte de gránulos y la función de TDP-43 [revisado en (Leko et al., 2019)]. Las expansiones en C9orf72 se encuentran en el 30 a 50 % de los casos de ELAf, en cerca de 25% de las DFT familiares, y en 5% de las formas esporádicas de ambas (Majounie et al., 2012; van der Zee et al., 2013). Otros genes y alteraciones proteicas también conectan la ELA y la FTD, incluyendo la proteína de unión al ADN TAR-43 (TDP-43), la fusionada en sarcoma (FUS) y secuestroma-1 (SQSTM1), con efecto **autosómico dominante**; por otro lado, una porción significativa de la ELAe también puede explicarse por una contribución poligénica (Ji et al., 2017). Alrededor de 100 loci genéticos que predisponen a la ELA con baja penetrancia y una contribución individual baja, han sido revelados por estudios de asociación del genoma completo (en inglés, GWAS: genome-wide association study o WGAS: whole genome association study) (Cirulli et al., 2015; Lattante, Ciura, Rouleau, & Kabashi, 2015). Las primeras alteraciones genéticas fueron identificadas en 1993, cuando Rosen et al. describieron 11 mutaciones puntuales en el gen de la Superóxido Dismutasa 1 (SOD1) en 13 familias (Rosen et al., 1993). Las mutaciones en el gen SOD1 son las más frecuentes luego del C9orf72 descubierto más recientemente. Los factores genéticos conocidos hasta el momento y su contribución a la ELA se resumen en la figura [1](#).

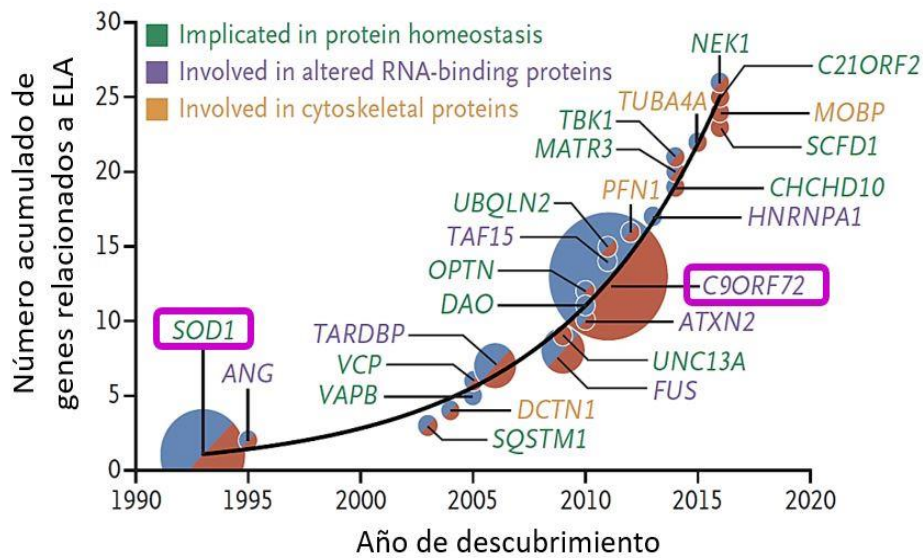


Figura 1. Los factores genéticos se asocian a 2/3 de los casos de ELAe y en una significativa proporción de las ELAe. El tamaño de círculos es proporcional al número de casos asociados al gen; el color rojo corresponde a las ELAe y el azul a las ELAf, y los de doble color a ambos. Los más frecuentes, asociados a mayor número de casos, son los de la SOD1 y C9ORF72. Imagen modificada de (R. H. Brown & Al-Chalabi, 2017)

1.4.5- Modelos de investigación en ELA

Los hallazgos de las alteraciones genéticas permitieron la generación de modelos animales transgénicos para la SOD1 humana portadora de alguna de las mutaciones, útiles para el estudio de mecanismos básicos de la enfermedad y otros estudios preclínicos. En 1994 se publicó el primer modelo de ratón (Gurney et al., 1994) y en 2002 el de rata (Howland et al., 2002), portadores de la SOD1 humana con la mutación puntual de una glicina por una alanina en el sitio 93 (SOD1G93A). Posteriormente se generaron modelos animales y celulares con estas y otras mutaciones tanto en roedores como en otras especies (Van Damme, Robberecht, & Van Den Bosch, 2017).

Más recientemente, con el avance de la tecnología de reprogramar las células somáticas adultas humanas en células madre pluripotentes inducidas (iPSC), se han logrado desarrollar nuevos modelos a partir de iPSCs obtenidas de pacientes con varias formas ELAf y algunas de ELAe, potencialmente más relevantes para la patología, ya que provienen directamente de pacientes (Richard & Maragakis, 2015; Rinaldi, Motti, Ferraiuolo, & Kaspar, 2017). Sin embargo, aunque se han señalado algunas limitantes, los modelos celulares y animales G93A y portadores de otras alteraciones genéticas relacionadas a la ELA siguen siendo insustituibles para algunos tipos de experimentos y han permitido la generación de gran parte del conocimiento actual (Van Damme et al., 2017). Más aún, dado que las

características clínicas de la ELA no permiten en general diferenciar la ELAf de la ELAe, excepto para algunas mutaciones (Goutman, Chen, Paez-Colasante, & Feldman, 2018), los resultados obtenidos en los modelos transgénicos tienen validez y gran relevancia en relación a la comprensión de mecanismos básicos de la muerte neuronal y su progresión independientemente del contexto genético (De Giorgio, Maduro, Fisher, & Acevedo-Arozena, 2019; Philips & Rothstein, 2015). Utilizando estos modelos se han establecido conceptos importantes como el de que la neurodegeneración no es exclusiva de un tipo celular determinado en la ELA, sino que el efecto de las mutaciones es necesario no solamente en las motoneuronas sino también en otros tipos celulares como las células gliales para que la enfermedad se exprese (Boillée, Vande Velde, & Cleveland, 2006; Boillée, Yamanaka, et al., 2006; Iliava, Polymenidou, & Cleveland, 2009; Lobsiger & Cleveland, 2007; Yamanaka et al., 2008).

1.4.6 - Mecanismos patogénicos en la ELA y tratamientos específicos

Aunque la investigación es intensa, y se han detectado múltiples mutaciones, muchas de ellas causales, el origen de la muerte de las MNs y su progresión, responsable de los síntomas clínicos y de la muerte de los pacientes sigue sin resolverse, y más aún en los casos esporádicos o familiares sin alteraciones genéticas conocidas. No se cuenta con tratamientos curativos ni pruebas específicas de laboratorio que proporcionen un diagnóstico definitivo de ELA en etapas tempranas. Hasta hace poco, el único fármaco indicado como modificador de la enfermedad era el Riluzol, una droga con acción antiglutamatérgica aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos en 1996, que prolonga la supervivencia en 83 días (mediana de supervivencia=532 días en el grupo tratado con Riluzol, 449 días en el grupo placebo) [(Bensimon, Lacomblez, Meininger, & Group, 1994), revisión en (R. G. Miller, Mitchell, & Moore, 2012)]. En 2017, 22 años después, la FDA aprobó otro fármaco para la ELA, el antioxidante edaravone (FDA, 2017), que mostró efectos modestos sobre la evolución funcional en pacientes en etapa temprana de la enfermedad (2.49 en 48 puntos del ALSFRS-R, SE 0.76, 95% CI 0.99–3.98; $p=0.0013$) a favor del edaravone (The writing group on behalf of the Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study, 2017), pero sin eficacia cuando el tratamiento se inicia en etapas tardías (The writing group on behalf of Edaravone (MCI-186) ALS 18 Study, 2017).

Por los antecedentes mencionados, el estudio más profundo de los mecanismos involucrados en la patogenia de la ELA puede arrojar luz para proponer nuevas terapias modificadoras de la patología en general, o indicadores diagnósticos que permitan describir y caracterizar las distintas formas de la enfermedad, posibilitando subclasificar los pacientes y proponer terapias personalizadas más precisas de acuerdo a las características genéticas

y fisiopatológicas más relevantes (van Es et al., 2017). Al igual que en otras END, en los pacientes o modelos experimentales de ELA, se han identificado múltiples mecanismos que subyacen en la patología, los cuales incluyen la excitotoxicidad, estrés oxidativo, alteraciones en la homeostasis del ARN y proteínas, llevando estas últimas a su mal plegamiento que genera agregados proteicos, y disrupción del transporte intracelular entre otros. Las alteraciones mitocondriales, incluyendo el daño en la cadena de transporte de electrones, la afectación de la fosforilación oxidativa, la elevada producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno y los defectos en la dinámica mitocondrial, están directa o indirectamente vinculadas a la mayoría de los mecanismos patogénicos postulados para la ELA (Smith, Shaw, & De Vos, 2017).

2. Rol de las mitocondrias en la ELA

2.1 Mitocondrias

Las mitocondrias tienen un rol central en el metabolismo celular. Participan en funciones esenciales que incluyen vías de regulación del metabolismo y señalización, proliferación y apoptosis (revisado en (Chiu & Dawes, 2012; DeBerardinis & Chandel, 2016; Hüttemann, Lee, Grossman, Doan, & Sanderson, 2012; Seo, Yoon, & Do, 2018)). Si bien son más reconocidas por su rol bioenergético de producción de adenosín 5'-trifosfato (ATP) a partir de sustratos obtenidos del metabolismo de los nutrientes durante la fosforilación oxidativa, en ellas ocurren numerosos procesos bioquímicos (o etapas de los mismos) que incluyen el ciclo de Krebs (ciclo de los ácidos tricarbónicos; CK), la β -oxidación de ácidos grasos, biosíntesis de aminoácidos y lípidos, síntesis de grupos hemo, homeostasis del calcio (Chandel, 2015; Rahman & Rahman, 2018). Dadas las diversas funciones celulares en que participan, no es sorprendente que la alteración en la función mitocondrial se ha implicado en un amplio espectro de enfermedades y procesos fisiopatológicos, incluyendo trastornos metabólicos, envejecimiento, cáncer y neurodegeneración (Deberardinis & Thompson, 2012; Go, Fernandes, Hu, Uppal, & Jones, 2018; Kashatus, 2018; Kawamata & Manfredi, 2017; Nunnari & Suomalainen, 2012; Picard & McManus, 2016; Serasinghe & Chipuk, 2017; Valcarcel-Jimenez, Gaude, Torrano, Frezza, & Carracedo, 2017; Y. Wu, Chen, & Jiang, 2019).

2.1.1- En la **estructura interna** de las mitocondrias se reconocen 4 componentes básicos: una membrana mitocondrial externa (MME) relativamente lisa y una interna (MMI) que forma pliegues o crestas mitocondriales, las cuales definen 2 compartimientos acuosos, el espacio intermembrana (EIM) entre ambas, y una matriz mitocondrial por dentro de la MMI (figura 2). Esta morfología a nivel ultraestructural se identificó inicialmente por microscopía electrónica

de transmisión (Palade, 1953), y es consistente con la aceptada hipótesis del origen endosimbiótico del organelo, en conjunto con el hecho de que poseen su propio genoma, cuya información fue cambiando, perdiéndose o transfiriéndose al núcleo durante la evolución (Roger, Muñoz-Gómez, & Kamikawa, 2017). El ADN mitocondrial (mtADN) es circular y se organiza en nucleoides localizados en la matriz, donde además se encuentra el sistema de transcripción y traducción que en general es codificado por el propio mtADN además de algunos mensajeros, fundamentalmente codificantes de proteínas de la cadena respiratoria (Ott, Amunts, & Brown, 2016). La MME tiene un rol fundamental de intercambio con el entorno intracelular; tiene los sistemas de translocación para la importación de las proteínas codificadas en el ADN nuclear sintetizadas en el citosol, y participa de los sitios de contacto de membrana con otros organelos membranosos (retículo endoplásmico, complejo de Golgi, lisosomas, peroxisomas) e inclusiones lipídicas, que tienen funciones principalmente en el intercambio de lípidos y calcio (Helle et al., 2013; Y. Kang, Fielden, & Stojanovski, 2018; Murley & Nunnari, 2016). La MMI se organiza en 2 dominios con composición diferente: el sector de la MMI delimitante de la matriz (MMID), cercano a la MME contiene principalmente los translocadores para proteínas que deben ingresar desde el EIM a la matriz, mientras que en las crestas (MMIC) se localizan los complejos de la cadena respiratoria y la ATP sintasa. La región de unión entre ambos dominios, o unión de las crestas (crista junctions, CJ) es estabilizado por un complejo proteico, el sistema organizador del sitio de contacto mitocondrial y de las crestas (mitochondrial contact site and cristae organizing system, MICOS; ver figura [2.A](#)), que también conecta la región de las CJs con la MME (Rampelt, Zerbes, van der Laan, & Pfanner, 2017; van der Laan, Horvath, & Pfanner, 2016; Wollweber, von der Malsburg, & van der Laan, 2017). El mantenimiento de la estructura de las crestas es necesario para el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria. La ultraestructura (el número, extensión y morfología de las crestas, la distancia entre ellas y en su interior, la distancia entre las MMI y MME) puede variar en diferentes condiciones dependiendo del estado metabólico y serían regulados por estos complejos y sus interacciones con otros componentes (Bulthuis, Adjobo-Hermans, Willems, & Koopman, 2019; Wollweber et al., 2017).

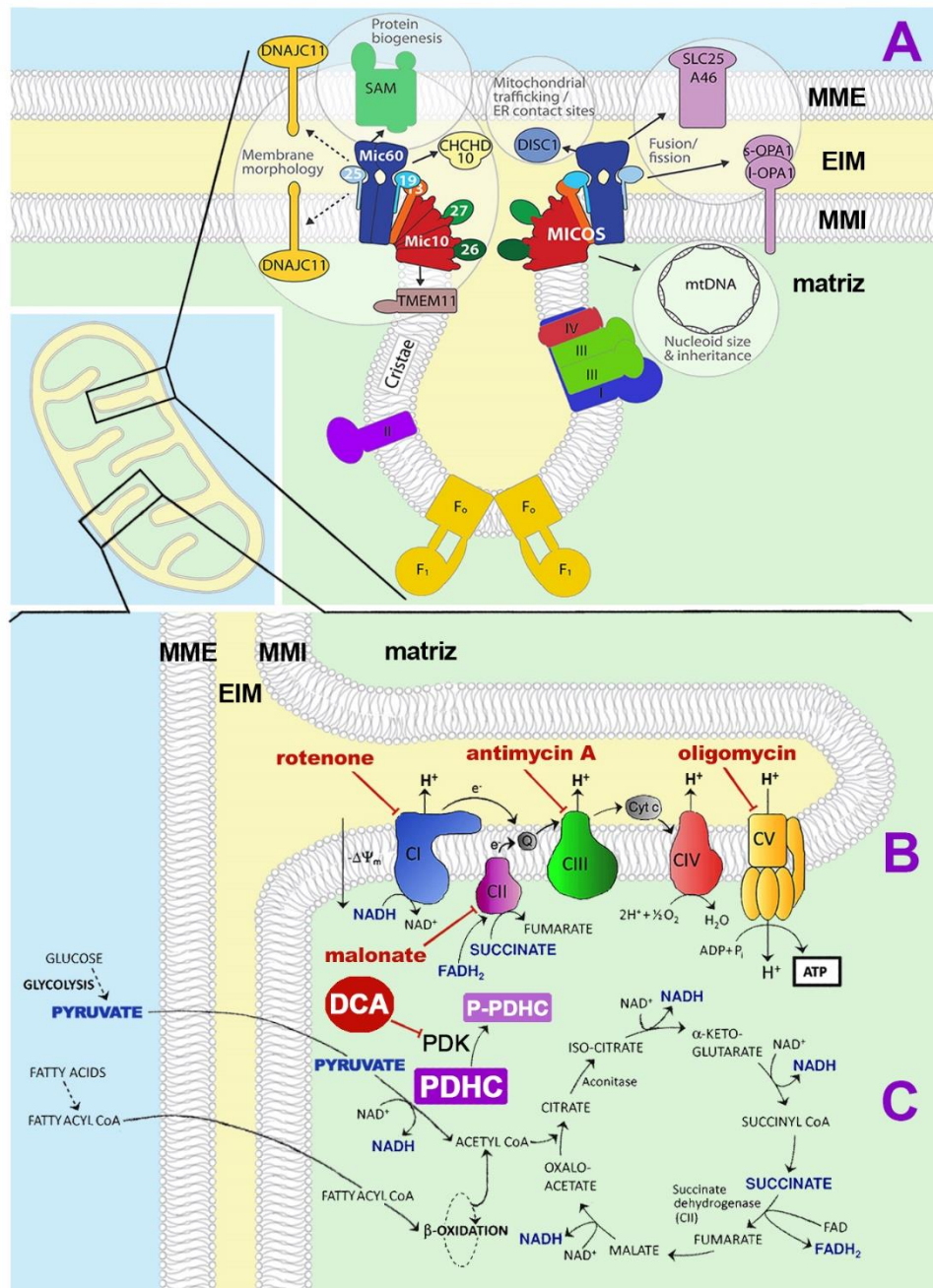


Figura 2. Estructura y función bioenergética mitocondrial. (A) Organización y distribución de los complejos en la región de las MMI de las crestas, se observa la organización del sistema MICOS que estabiliza la zona de las CJs, y los dímeros de la ATP sintasa en los extremos. (B) Bioenergética de la cadena respiratoria (CRM) y (C) el ciclo de Krebs (CK). El **piruvato**, producto de la glicólisis en el citosol, ingresa a la mitocondria y se convierte acetil Co-A por acción del **PDHC** en la matriz. La acetil-CoA ingresa al CK donde las distintas etapas enzimáticas generan moléculas de alta energía como **NADH**, **GTP** y **FADH₂**. Los electrones ingresan a la (CRM) desde el **NADH** vía el Complejo I (CI) y desde el **succinato** vía Complejo II (CII). Los complejos I, III y IV bombean protones hacia el EIM. El gradiente generado (potencial de membrana mitocondrial, $-\Delta\Psi_m$) es disipado por la ATP sintasa (CV), que fosforila el ADP para formar ATP. La CRM puede ser inhibida experimentalmente en distintos niveles como se indica con rojo. También se indica la acción inhibitoria del DCA sobre la PDK. Imágenes modificadas de (Polyzos & McMurray, 2017) (A,B) y (Rampelt et al., 2017) (B,C).

2.1.2- La **morfología externa** de las mitocondrias, su tamaño (diámetro y longitud), interconexiones y posicionamiento es variable entre distintos tipos celulares, y en cada célula tienen un comportamiento dinámico; cambian a lo largo del tiempo dependiendo de su estado funcional y requerimientos, en lo que se conoce como **dinámica mitocondrial**. Las mitocondrias pueden presentarse como filamentos largos formando redes de distintos grados de extensión y complejidad, o como bastones más cortos o granulares, (Collins, Berridge, Lipp, & Bootman, 2002; Kuznetsov, Hermann, Saks, Hengster, & Margreiter, 2009). Esta dinámica requiere de movimientos de los organelos mediante interacciones con el citoesqueleto (Bartolák-Suki, Imsirovic, Nishibori, Krishnan, & Suki, 2017; van der Blik, Shen, & Kawajiri, 2013), y de la participación de una serie de GTPasas, que median la fusión (Mitofusinas 1 y 2 en la MME, y OPA-1 en la MMI) o la fisión, que resulta de la translocación de la proteína citosólica Drp1 a la mitocondria, donde interactúa con distintas proteínas potencialmente receptoras en la MME: mitochondrial fission factor (Mff), mitochondrial dynamics proteins 49 y 51 (MiD49 y MiD51) y Fis1, generando multímeros que tras un cambio conformacional provocan la constricción del organelo (Chan, 2012; Dorn, 2018; Pagliuso, Cossart, & Stavru, 2018). La fisión genera organelos pequeños, morfológica y funcionalmente independientes, estado necesario para su transporte intracelular, su dirección a la autofagia, la liberación del citocromo c durante la apoptosis, o su reparto entre las células hijas durante la mitosis, mientras que la fusión determina la mezcla y unificación del compartimento mitocondrial, siendo esta la morfología típica de mitocondrias funcionales acopladas a la producción de ATP (Galloway, Lee, & Yoon, 2012; Mishra & Chan, 2014, 2016; Westermann, 2010). Por otro lado, el aumento de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (A. Cassina & Radi, 1996; Quijano, Trujillo, Castro, & Trostchansky, 2016; Radi, Cassina, Hodara, Quijano, & Castro, 2002), generadas por la propia mitocondria durante la respiración o en otros sitios en distintos estados fisiopatológicos incluyendo la inflamación, pueden llevar a la aparición de nuevos procesos de dinámica mitocondrial, incluyendo la formación de mitocondrias esféricas o toroides tipo “dona” (Ding et al., 2012; Gaskins et al., 2017; X. Liu & Hajnóczky, 2011; Long et al., 2015; Miyazono et al., 2018). Estos antecedentes muestran que la morfología está ampliamente relacionada con la función y disfunción mitocondrial. El concepto de “mitochondrial morphofunction”, propuesto por Bernard y Rossignol (Benard & Rossignol, 2008), ha sido recientemente resaltado y extensamente abordado (Bulthuis et al., 2019). En el mismo sentido, en el marco de núcleo interdisciplinario IMAGINA, hemos estudiado cambios en descriptores morfológicos mitocondriales en astrocitos y otros tipos celulares asociados a modificaciones de la función respiratoria mitocondrial (Chavarría, Rodríguez-Bottero, Quijano, Cassina, & Souza, 2018; Martínez et al., 2019; Rodríguez-Bottero et al., 2016).

2.1.3- Función bioenergética mitocondrial: El metabolismo intermediario de las mitocondrias es responsable de la mayor parte del ATP generado en muchos tipos celulares y tejidos mediante el transporte de electrones en la CRM acoplado a la fosforilación oxidativa. Esta actividad bioenergética se conecta, regula y es modulada en relación con las demás funciones en que participan. Las mitocondrias albergan los principales sistemas enzimáticos utilizados para completar la oxidación de azúcares, grasas y proteínas para producir energía utilizable en forma de ATP. Estos sustratos se pueden catabolizar a acetil-coenzimaA (acetil-CoA), que luego ingresa al CK que tiene lugar en la matriz mitocondrial. Los azúcares se metabolizan mediante glicólisis en el citosol, y su producto piruvato ingresa a las mitocondrias donde el complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC) facilita su conversión a acetil-CoA. La beta-oxidación de los ácidos grasos produce acetil-CoA dentro de las mitocondrias, mientras que existen varias enzimas para la conversión de aminoácidos específicos en piruvato, acetil-CoA o directamente en intermediarios particulares del CK. En el CK, el grupo acetilo (2 carbonos) de la acetil-CoA se transfiere al oxaloacetato (4 carbonos), formando el citrato (6 carbonos); luego, en una serie de siete pasos enzimáticos (ver figura [2.C](#)), el citrato se oxida de nuevo a oxaloacetato que continúa en el ciclo; en el proceso se liberan 2 moléculas de dióxido de carbono y los electrones eliminados pasan a los cofactores nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y flavina adenina dinucleótido (FADH₂), que transfieren la energía liberada a la cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria mitocondrial (CRM) (Alberts et al., 2015). La actividad de la CRM consiste en la transferencia secuencial de electrones entre cuatro complejos multienzimáticos en la MMI: la NADH:ubiquinona oxidorreductasa (NADH deshidrogenasa; complejo I, CI), la succinato:ubiquinona oxidorreductasa (succinato deshidrogenasa; complejo II, CII), el complejo ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa (citocromo bc1, complejo III, CIII) y la citocromo c oxidasa (complejo IV, CIV). Además, la transferencia de electrones se asegura mediante la difusión de dos componentes móviles que actúan como cosustratos: la ubiquinona, también denominada coenzima Q, lipofílica, embebida en la bicapa lipídica de la MMI, y la hemoproteína hidrofílica citocromo c ubicada en la superficie externa de la MMI (ver la figura [2.B](#)). El NADH generado en el CK difunde hasta la MMI donde sus electrones ingresan a la CRM en el CI; por otro lado, la enzima que genera el FADH₂ en el CK es la succinato deshidrogenasa, que es parte de la CRM (es el CII). La coenzima Q capta los electrones de ambas fuentes (NADH y FADH₂), transfiriéndolos al CIII que se organiza como dímero (CIII₂), luego al citocromo c y finalmente al CIV, que los traslada al oxígeno molecular. Este flujo de electrones está acoplado al bombeo de protones desde la matriz al EIM a través de los complejos I, III y IV, lo cual genera un gradiente electroquímico a través del IMM, o **potencial de membrana mitocondrial (-ΔΨ_m)**, creando una **fuerza protón-motriz (pmf)**. El gradiente es disipado por la ATP sintasa (complejo V, CV), cuyo canal de

protones permite el flujo de los mismos de regreso hacia la matriz, y conduce a cambios conformacionales en sus sitios de unión a nucleótidos y a la formación de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa (Kadenbach, 2012; Osellame, Blacker, & Duchen, 2012; Sousa, D'Imprima, & Vonck, 2018). La figura 2 muestra la localización de los complejos en la MMI (figura 2.B) y el esquema del CK (figura 2.C) en la matriz. El gradiente no disipado por la ATP sintasa es convertido en calor por fuga de protones pasiva o a través de proteínas desacoplantes (Jastroch, Divakaruni, Mookerjee, Treberg, & Brand, 2010; Kadenbach, 2012; Porter, 2012).

Los complejos de la CRM establecen a su vez interacciones formando estructuras supramoleculares denominadas **supercomplejos** (SC). La composición y abundancia de estos SCs es variable entre distintos organismos y tejidos, dependiendo de las condiciones metabólicas y el contenido lipídico de la MMI. En la mayoría de los eucariotas el CI interactúa principalmente con CIII₂ y CIV para formar el SC más abundante, I+III₂+IV₁, al que se agregan monómeros de CIV adicionales para formar los supercomplejos I+III₂+IV₂₋₄. Estas estructuras se conocen como **respirasomas**, ya que contienen todos los componentes necesarios para transferir electrones del NADH al oxígeno molecular. En los mamíferos la mayor parte del CI, aproximadamente 40-50% del CIII₂, y 20-30% del CIV se localizan en los grandes supercomplejos I+III₂+IV₁₋₄ o en SCs transitorios I+III₂. Entre 5 y 10% de las estructuras de la CRM son SC III₂+IV₁, existiendo también complejos aislados individuales, sobre todo CIII₂ y IV₁₋₂ (Lobo-Jarne & Ugalde, 2018). El CV, ATP sintasa conforma dímeros localizados en los extremos "libres" opuestos a la zona de las CJs, favorecen y mantienen el plegamiento de la MMI en ese sector (figura 2.A) (Rampelt et al., 2017).

2.1.4- El flujo de electrones en la CRM genera especies reactivas del oxígeno, fundamentalmente superóxido por reducción en un electrón del oxígeno molecular principalmente por el CI y el CIII (Murphy, 2009). El superóxido es precursor de otras especies más reactivas oxidantes como peróxido de hidrógeno o nitrantes como el peroxinitrito, este último producto de su reacción con el óxido nítrico (Figueira et al., 2013; Kowaltowski, de Souza-Pinto, Castilho, & Vercesi, 2009; Quijano et al., 2016; Radi et al., 2002). Las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno tienen acciones señalizadoras en condiciones fisiológicas o patológicas; pueden regular rutas de señalización intracelular a través de la oxidación de residuos de cisteína en quinasas, fosfatasa u otros factores, modificando lípidos o ácidos nucleicos (Zhao, Jiang, Zhang, & Yu, 2019). Las especies nitrooxidantes están involucradas en la regulación de distintos procesos como la fisión/fusión, biogénesis y autofagia mitocondrial (Hill et al., 2013; X. Liu & Hajnóczky, 2011; Willems, Rossignol, Dieteren, Murphy, & Koopman, 2015; S. Wu, Zhou, Zhang, & Xing, 2011),

modulando así eventos celulares como la apoptosis o la proliferación celular (Antico Arciuch, Elguero, Poderoso, & Carreras, 2012; Chiu & Dawes, 2012; Orrenius, Gogvadze, & Zhivotovsky, 2007; Westermann, 2010). La mitocondria puede además ser blanco de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (A. Cassina & Radi, 1996), y el aumento de los niveles de estas especies y el estrés nitro oxidativo se ha vinculado a diversas patologías incluyendo las END (Akbar et al., 2016; Islam, 2017; Singh, Kukreti, Saso, & Kukreti, 2019).

2.2 Alteraciones mitocondriales en la ELA

En la ELA o en los modelos de la enfermedad se han detectado anomalías morfológicas, ultraestructurales y funcionales de las mitocondrias, a nivel de las MNs o el músculo esquelético (Duffy, Chapman, Shaw, & Grierson, 2011; Dupuis, 2014; Kawamata & Manfredi, 2010; Manfredi & Xu, 2005; Palomo & Manfredi, 2014; Tan, Pasinelli, & Trotti, 2014), o en las glías (P. Cassina et al., 2008; Miquel et al., 2012).

Mediante microscopía electrónica se han observado mitocondrias aumentadas de tamaño, vacuoladas, con crestas dismórficas y conformando agregados en la médula espinal y el músculo esquelético de pacientes con ELA (Myoung & Suh, 2002; Sasaki & Iwata, 2007) y en roedores transgénicos modelos de la enfermedad (Bendotti et al., 2001; Higgins, Jung, & Xu, 2003; Jaarsma et al., 2000; Sasaki, 2010; Sasaki, Aoki, Nagai, Kobayashi, & Itoyama, 2009).

En modelos celulares, la expresión de TDP-43 o SOD1 mutantes generó mitocondrias con morfología fragmentada, muchas veces formando agregados (Magrané, Cortez, Gan, & Manfredi, 2014; Magrané et al., 2009; Wang et al., 2013).

También se han observado alteraciones en la distribución de las mitocondrias en los axones motores de ratones SOD1 G93A y SOD1G85R, las que forman agregados que colocalizan con las proteínas mutadas (Vande Velde et al., 2011). Esto coincide con lo que reportamos previamente en las ratas SOD1G93A, específicamente en axones motores pero no en los sensoriales (Sotelo-Silveira et al., 2009).

La localización mitocondrial y la interacción de las proteínas relacionadas a la ELA con las mitocondrias ha sido mostrada en varios estudios. Por ejemplo, se ha demostrado la localización de la SOD1G93A en el EIM (Mattiazzi et al., 2002), su interacción con el canal aniónico dependiente de voltaje 1 (VDAC1) disminuyendo su conductancia y el pasaje de ADP a través de la MME (Israelson et al., 2010), o con el Bcl-2 promoviendo estrés oxidativo y apoptosis (Pasinelli et al., 2004). Además, la localización mitocondrial de las proteínas mutadas TDP-3 (Wang et al., 2016) o FUS (Deng et al., 2015) provocan daño y alteraciones funcionales en el organelo y toxicidad neuronal.

Evidencia directa de que la alteración de la estructura y función mitocondrial puede contribuir a la etiología de la ELA proviene del descubrimiento de mutaciones causales en la proteína

mitocondrial CHCHD10 que se localiza en los MICOS (Bannwarth et al., 2014; Genin et al., 2016).

También se han documentado alteraciones de la actividad respiratoria y producción de ATP mitocondrial en la ELA. En pacientes con ELA ha sido reportada una reducción de la actividad enzimática de los complejos de la CRM a nivel de la médula espinal (Borthwick, Johnson, Ince, Shaw, & Turnbull, 1999; Wiedemann, Manfredi, Mawrin, Flint Beal, & Schon, 2002) y en el músculo estudiando la actividad respiratoria (Wiedemann et al., 1998). Además, una reducción de la actividad del complejo I y de la relación ATP/ADP fue identificada en linfocitos sanguíneos de pacientes comparados con controles (Ghiasi, Hosseinkhani, Noori, Nafissi, & Khajeh, 2012). También se han identificado alteraciones metabólicas en líneas de fibroblastos obtenidos de pacientes con ELA utilizando análisis de flujo extracelular, resultando un fenotipo más glicolítico que los controles en aquellos casos portadores de mutaciones en la SOD1 (S. P. Allen et al., 2014), aunque en otros casos se han encontrado perfiles hipermetabólicos con una actividad mitocondrial aumentada (Konrad et al., 2017). En modelos murinos SOD1G93A, estudios de respirometría utilizando electrodos de Clark en mitocondrias aisladas de la médula espinal mostraron una reducción del índice de control respiratorio en ratones (Mattiuzzi et al., 2002) y ratas (P. Cassina et al., 2008) comparadas con los controles. Resultados similares se obtuvieron utilizando respirometría de alta resolución en médula espinal (Miquel et al., 2012, 2014) y músculo (Miquel et al., 2014) de ratones SOD1G93A.

3. Glía y neuroinflamación en la ELA

3.1- Células gliales

Las células gliales son fundamentales en la organización de la arquitectura del SN, además de cumplir tareas esenciales de soporte trófico, metabólico y funcional, y regulando así el microambiente del SN. Su número, volumen, complejidad y diversidad morfológica están directamente relacionados al tamaño o complejidad funcional neuronal, tanto comparando entre diferentes especies como en diferentes regiones del sistema nervioso (Herculano-Houzel, 2014; Matyash & Kettenmann, 2010; Oberheim, Goldman, & Nedergaard, 2012; Verkhratsky, 2010). Las células gliales que se reconocen clásicamente en el SNC son los astrocitos, oligodendrocitos, microglía, ependimocitos, células del epitelio coroideo, y más recientemente un cuarto grupo celular glial correspondiente a los ploidendrocitos o células NG2 (N. J. Allen & Barres, 2009). Los oligodendrocitos con sus prolongaciones forman segmentos mielínicos a varios axones que quedan anatómicamente agrupados, las células microgliales se entretajan en los circuitos neurales formando sus propios "dominios de

defensa” no solapados entre sí, y los astrocitos subdividen el parénquima de acuerdo a sus territorios anatómicos (Verkhratsky, 2010).

3.1.1- Los **astrocitos**, al igual que las neuronas y oligodendrocitos, se originan a partir del neuroectodermo del tubo neural. Presentan múltiples prolongaciones primarias que irradian desde el soma y se ramifican ampliamente formando una densa red de procesos terminales que en un astrocito adulto ocupan un dominio espacial de entre 20.000 y 80.000 μm^3 en roedores y un volumen 30 veces mayor en humanos; pudiendo cada astrocito protoplasmático envolver cerca de 1.000 sinapsis en roedores y 2.000.000 en seres humanos (Freeman, 2010; Oberheim Bush & Nedergaard, 2017; Oberheim, Wang, Goldman, & Nedergaard, 2006). La morfología es más compleja en los astrocitos protoplasmáticos de la sustancia gris que en los fibrosos de la sustancia blanca, cuyas prolongaciones son más escasas pero extendidas por mayores distancias; existen también formas intermedias o específicas dependiendo de la región anatómica.

Las funciones de los astrocitos involucran la regulación de la neurotransmisión, como parte de la sinapsis tripartita mediante la gliotransmisión (Araque, Parpura, Sanzgiri, & Haydon, 1999), o controlando la concentración de neurotransmisores como en el caso de las sinapsis glutamatérgicas. En estas últimas son responsables de captar la mayor parte del glutamato de la hendidura sináptica (Verkhratsky, 2010; Verkhratsky & Kirchhoff, 2007) mediante transportadores de aminoácidos excitatorios (EAA) específicos, fundamentalmente EAAT1 (GLAST) y EAAT2 (GLT1) (Murphy-Royal, Dupuis, Groc, & Oliet, 2017). Los astrocitos participan también en la homeostasis de otros neurotransmisores, el agua y balance iónico, en la producción de moléculas señalizadoras y factores tróficos, así como en el desarrollo y regulación de la barrera hematoencefálica (BHE) (Eroglu & Barres, 2010; Freeman, 2010; Matias, Morgado, & Gomes, 2019; Vasile, Dossi, & Rouach, 2017; Verkhratsky, 2010).

Los astrocitos constituyen entonces una población heterogénea en su distribución, morfología y funciones, dependiendo de su localización, el período del desarrollo o del estado fisiopatológico.

3.1.2- La **microglía**, a diferencia de los demás tipos celulares del parénquima que se originan del neuroectodermo, se genera a partir de precursores derivados del mesodermo del saco vitelino, que colonizan el SNC durante el desarrollo prenatal (Ginhoux et al., 2010). Forman una población de células que se autorrenuevan y constituyen el sistema inmune innato en el SNC, en forma similar a otras poblaciones de macrófagos en tejidos periféricos, pero con un fenotipo particular propio (Yamasaki et al., 2014).

Su morfología microglial es variable entre distintas regiones del SNC y momentos del desarrollo. En el adulto la forma más común es la microglía ramificada, con un pequeño

cuerpo celular y prolongaciones largas y delgadas. Durante el desarrollo pueden presentar morfología ameboide, mientras que en el envejecimiento normal adoptan un aspecto hipotrófico o distrófico con prolongaciones más cortas y delgadas (Savage, Carrier, & Tremblay, 2019; Tay, Savage, Hui, Bisht, & Tremblay, 2017).

Durante el desarrollo del SNC, la microglía regula la neurogénesis, migración y supervivencia (y apoptosis) neuronal, además de la sinaptogénesis, mediante la producción de factores tróficos, fagocitosis de detritos celulares o remodelación de la matriz extracelular (Mosser, Baptista, Arnoux, & Audinat, 2017). Durante la etapa postnatal, la microglía regula la neurogénesis y plasticidad sináptica durante el aprendizaje (Schafer et al., 2012) y cumple un rol homeostático, monitoreando continuamente el entorno con sus prolongaciones, las cuales respondiendo a cambios o injurias leves pueden fagocitar pequeñas partículas sin incurrir en cambios morfológicos importantes (Davalos et al., 2005; Eyo & Wu, 2019; Nimmerjahn, Kirchhoff, & Helmchen, 2005).

En forma similar a los astrocitos, el fenotipo de las células microgliales, además de diverso, es plástico, es decir que cambia en respuesta a distintas señales del entorno, ya sea en distintas etapas del desarrollo, cambios fisiológicos o patológicos (Butovsky & Weiner, 2018; Savage et al., 2019; Silvin & Ginhoux, 2018; Stratoulis, Venero, Tremblay, & Joseph, 2019).

3.1.3- Marcadores fenotípicos de las células gliales

La heterogeneidad fenotípica que vimos para astrocitos y microglía es una característica de los distintos tipos celulares del SNC. Esta propiedad ha sido recientemente reafirmada mediante análisis del patrón de expresión génica de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos (Cahoy et al., 2008) y microglía (Hickman et al., 2013; Q. Li et al., 2019) del cerebro de ratón, así como también en células gliales y progenitores del cerebro humano (Zhang et al., 2016). Sin embargo, independientemente de su heterogeneidad, las células gliales expresan moléculas específicas que permiten su identificación.

La detección de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) de los filamentos intermedios, aunque marca no más del 15 % del volumen celular (Bushong, Martone, Jones, & Ellisman, 2002), es una de las más utilizadas en la identificación de astrocitos por su especificidad; tiene la limitante de que no todos los astrocitos la expresan, pero es útil fundamentalmente cuando están reactivos ya que ocurre un aumento de su expresión o redistribución (Anderson, Ao, & Sofroniew, 2014). Otros marcadores que se utilizan incluyen la proteína de unión al calcio S100 β , la glutamina sintasa (GS), los transportadores de aminoácidos excitatorios EAAT1 (GLAST) y EAAT2 (GLT-1), acuaporina-4 y conexina 43 (Cx43) (Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Para identificar la microglía uno de los marcadores más utilizados es la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado (Ionized calcium Binding Adapter molecule) o proteína Iba-1 que presenta una señal con una buena distribución citoplasmática que incluye las

prolongaciones celulares; otros marcadores de microglía incluyen las proteínas CD68 y CD11b, también presentes en monocitos y macrófagos (Korzhevskii & Kirik, 2016).

3.3- Respuesta de las células gliales frente al daño y neurodegeneración

En situaciones de daño, las células gliales responden con cambios fenotípicos denominados en conjunto **gliosis reactiva o reactividad glial**, que involucra principalmente a la microglía y los astrocitos e incluyen modificaciones morfológicas, en la expresión de mediadores y en la mayoría de los casos proliferación (Heneka, Rodríguez, & Verkhratsky, 2010). Esta reactividad glial forma parte de la respuesta de **neuroinflamación**, (Masgrau et al., 2017; Ransohoff, 2016b) que describimos antes y que profundizamos a continuación.

3.3.1 – La activación de los astrocitos implica alteraciones en la expresión de diversas moléculas, hipertrofia y otros cambios morfológicos tales como redistribución del citoesqueleto, formación de prolongaciones y aumento de su diámetro y longitud, proliferación y/o formación de cicatriz glial en grado variable. Estas modificaciones son reguladas por señales específicas según el contexto y pueden modificar la actividad astrocitaria ya sea con pérdida o ganancia de funciones que afectan en forma beneficiosa o perjudicial a las células vecinas (Sofroniew & Vinters, 2010; Zamanian et al., 2012). Según la naturaleza y severidad del insulto, se pueden observar grados de reactividad glial: la astrogliosis leve a moderada implica hipertrofia, sin proliferación ni pérdida de los dominios celulares individuales y redistribución de GFAP, mientras que en la injuria más severa y en la neurodegeneración ocurre interdigitación y solapamiento de los dominios celulares, mayor aumento de GFAP y proliferación (Anderson et al., 2014). Además de la reentrada en el ciclo celular de astrocitos locales (Buffo et al., 2008; Sofroniew, 2009), la proliferación, diferenciación y migración de progenitores endimarios y subependimarios (Barnabé-Heider et al., 2010; Carlén et al., 2009; Doetsch, Caillé, Lim, García-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1999) pueden contribuir al aumento del número de astrocitos. Si bien los fenotipos pueden variar, se pueden distinguir básicamente astrocitos pro-inflamatorios y neurotóxicos o anti-inflamatorios con actividad neuroprotectora, que recientemente han sido denominados como A1 y A2 respectivamente (Clarke et al., 2018; Hinkle, Dawson, & Dawson, 2019; Liddel et al., 2017).

3.3.2 - Con respecto a la activación de la microglía en la neuroinflamación, ocurren cambios morfológicos como en otros macrófagos tisulares. Las prolongaciones de la microglía se hacen más cortas y menos ramificadas, el soma adquiere mayor tamaño constituyendo la microglía hipertrófica, y en algunos casos pueden alcanzar una morfología ameboide y migrar hacia un sitio de lesión además de proliferar y cambiar su fenotipo

molecular (Butovsky & Weiner, 2018; Savage et al., 2019). Otro elemento de la activación es la proliferación; y aunque en algunos tipos de daño pueden ingresar nuevos macrófagos, la proliferación de la microglía residente es la que contribuye mayormente al aumento del número de células en la microgliosis que acompaña a la neurodegeneración (Prinz, Priller, Sisodia, & Ransohoff, 2011). Dada la diversidad de los fenotipos homeostáticos, los posibles fenotipos activados también son variados (Stratoulis et al., 2019). Sin embargo, aún a riesgo de sobresimplificar (Ransohoff, 2016a), es útil establecer dos fenotipos extremos: puede ocurrir una activación clásica (M1) proinflamatoria y citotóxica, con producción de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas del oxígeno, o una activación alternativa (M2) que bloquea las respuestas proinflamatorias y genera citoquinas antiinflamatorias y factores neurotróficos (Glass, Saijo, Winner, Marchetto, & Gage, 2010).

3.4- Neuroinflamación en la ELA

En el ratón transgénico SOD1G93A, modelo de ELA, ocurre aumento de la proliferación de progenitores neurales pluripotenciales en la zona periependimaria de la médula espinal, y migración de los mismos hacia el asta dorsal y ventral en etapas presintomáticas (Chi et al., 2006). Ocurre además una elevada proliferación en el asta ventral en la etapa sintomática, en la que solamente 5% de las células proliferantes serían astrocitos inmunomarcados para GFAP. La contribución mayoritaria a la proliferación estaría dada por la microglía y progenitores NG2, los cuales darían lugar a astrocitos (Magnus et al., 2008), aunque esto es controvertido (S. H. Kang, Fukaya, Yang, Rothstein, & Bergles, 2010).

3.4.1- Los astrocitos juegan un rol importante en la patogenia de la ELA (Barbeito et al., 2004). Por ejemplo, ocurre una alteración de los EAAT que podría conducir a excitotoxicidad (toxicidad generada por las concentraciones persistentemente elevadas de EAA), y podría explicar, al menos en parte, los niveles elevados de glutamato en muestras de pacientes (plasma, líquido cefalorraquídeo) con ELA de inicio reciente (revisado en (Rosenblum & Trotti, 2017)). La desregulación de los sistemas glutamatérgicos y la excitotoxicidad constituyen uno de los mecanismos subyacentes en la patogenia de la ELA (Van Den Bosch, Van Damme, Bogaert, & Robberecht, 2006) y la evidencia para el uso de Riluzol como tratamiento modificador del curso de la enfermedad.

Datos previos de nuestro grupo muestran que la exposición de astrocitos espinales neonatales a agentes nitrooxidantes como peroxinitrito, o a factores inflamatorios como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) o el factor de crecimiento fibroblástico 1 (FGF-1) genera cambios fenotípicos reactivos que incluyen cambios morfológicos, redistribución de GFAP y neurotoxicidad para MNs en cultivo (P. Cassina et al., 2005, 2002; Pehar et al., 2002;

Vargas et al., 2005). Nuestro grupo mostró también que, en forma similar a los astrocitos activados por factores oxidativos e inflamatorios, los astrocitos que expresan la SOD1G93A (astrocitos SOD1G93A) obtenidos de la médula espinal de ratas neonatales transgénicas para la enzima humana mutada, tienen un efecto tóxico sobre MNs en co-cultivos (Vargas, Pehar, Cassina, Beckman, & Barbeito, 2006). Ello fue posteriormente confirmado con astrocitos de ratones SOD1G93A (Nagai et al., 2007) o derivados de pacientes con ELA (Haidet-Phillips et al., 2011; Re et al., 2014).

Una aproximación para modular y revertir la toxicidad de los astrocitos SOD1G93A es estimular vías antioxidantes, como la mediada por Nrf2, ya sea con FGF-1/t-butylhydroquinona (Vargas et al., 2006, 2005) o agentes alquilantes como nitrolípidos (Díaz-Amarilla et al., 2016), que provoca entre otras, la inducción de hemoxigenasa-1 (HO-1) y las enzimas de síntesis de glutatión. Esta estrategia resultó beneficiosa también para mejorar el desempeño motor y/o supervivencia en los modelos murinos de ELA (Trostchansky et al., 2018; Vargas, Johnson, Sirkis, Messing, & Johnson, 2008).

3.4.2- La microglía también tiene un rol importante en la ELA. En modelos de ELA, en co-cultivos de MNs embrionarias con microglía de ratones salvajes neonatales, la exposición al mediador proinflamatorio LPS reduce la supervivencia de MNs (Xiao et al., 2007). Además, las microglías obtenidas de ratones SOD1G93A neonatales liberan más óxido nítrico y superóxido y menos factores tróficos que la microglía salvaje, y en concordancia inducen mayor muerte de MNs en co-cultivos (Xiao et al., 2007). Por otra parte, la microglía aislada de la médula espinal de ratones adultos en etapas tempranas de la patología es trófica para MNs salvajes, mientras que la que se aísla de ratones en la fase avanzada disminuye la expresión de marcadores M2, aumenta los M1 y resulta neurotóxica (Liao, Zhao, Beers, Henkel, & Appel, 2012); por lo que la neuroinflamación en este modelo de ELA, tendría una fase inicial de reparación antes de la fase final proinflamatoria neurotóxica (Hooten, Beers, Zhao, & Appel, 2015).

3.4.3- Células gliales aberrantes

Además de la microglía y los astrocitos, un grupo de células gliales con fenotipo aberrante pueden jugar un rol importante en el proceso neuropatológico en la ELA (Trías, Ibarburu, Barreto-Núñez, & Barbeito, 2016). Estas células gliales con fenotipo aberrante fueron identificadas en un trabajo previo, en el cual se aislaron a partir de la médula espinal de las ratas transgénicas SOD1G93A adultas en etapa sintomática, y se cultivaron con un procedimiento similar al utilizado para los cultivos de glía neonatal. En estas mismas condiciones no es posible la obtención de cultivos similares a partir de médula espinal de ratas no transgénicas (nTg) adultas (Díaz-Amarilla et al., 2011). Estas células, ya sea en co-

cultivos, como a través de factores solubles liberados al medio, mostraron una gran toxicidad para MNs espinales, la cual fue específica, ya que no afectó a otros tipos de neuronas como hipocámpales o sensoriales.

Inicialmente identificadas como astrocitos aberrantes fueron referidas como células “AbA” (del inglés, **Ab**errant **A**strocytes), por su morfología similar y dado que expresan varios marcadores de astrocitos como Cx43, GS, S100 β , y aunque en bajos niveles, también GFAP (Díaz-Amarilla et al., 2011). Sin embargo, posteriormente se encontraron evidencias de que podrían originarse a partir de microglía, co-expresando en algunas etapas los marcadores de astrocitos mencionados y también Iba1, CD11b y CD163 de microglía (Trías et al., 2013), por lo que de aquí en adelante las denominaremos **células gliales aberrantes (AbGCs)**. Las AbGCs exhiben características de estrés celular y activación inflamatoria (Jiménez-Riani et al., 2017) e inducen extensa gliosis cuando se trasplantan en la médula espinal de ratas nTg (Ibarburu et al., 2017), indicando su capacidad de generar y propagar el proceso neuroinflamatorio. Su fenotipo es altamente proliferativo y carece de inhibición por contacto, además de resistir múltiples pasajes sin senescencia replicativa en cultivo, (Díaz-Amarilla et al., 2011) características que las hacen similares a las células tumorales. En concordancia, el fenotipo de las AbGCs puede revertirse con el tratamiento con la droga antineoplásica masitinib, un inhibidor de tirosina kinasas, el cual redujo su proliferación y expresión de marcadores proinflamatorios (Trías, Ibarburu, Barreto-Núñez, Babdor, et al., 2016).

3.5- Metabolismo y función mitocondrial de la glía y su rol en la ELA

3.5.1- Función bioenergética de los astrocitos y acoplamiento metabólico glía-neurona: Un aspecto importante en el funcionamiento del SNC y la actividad neuronal es el nexo entre el metabolismo energético neuronal y glial. El transporte de glutamato por los astrocitos que mencionamos previamente, además de su rol en la regulación de la actividad sináptica, se asocia con su rol metabólico. Los astrocitos expresan la enzima glutamato deshidrogenasa, que media la reacción anaplerótica de metabolización del glutamato α -cetoglutarato alimentando el CK. También expresan la enzima glutamina sintasa, de manera que pueden utilizar el glutamato como precursor de glutamina, que no es tóxica, y puede liberarse al espacio extracelular. La glutamina puede ser entonces captada por las neuronas, que la utilizan como precursor para la síntesis de glutamato, en un circuito de acoplamiento metabólico neurona-glía (Bolaños, 2016; Verkhratsky, 2010). Otra enzima que expresan los astrocitos y que no está presente en las neuronas es la piruvato carboxilasa, pudiendo entonces formar oxalacetato para aportar al CK a partir del piruvato derivado de la glicólisis o de otras vías metabólicas (Schousboe, Waagepetersen, & Sonnewald, 2019). Por otro lado, los astrocitos son los principales almacenadores de glucógeno, cuya movilización

y metabolización, podría aportar lactato a las neuronas como fuente energética en condiciones de hipoglicemia o intensa actividad sináptica (A. M. Brown & Ransom, 2007, 2014). Este acoplamiento metabólico entre astrocitos y neuronas ha sido extensamente revisado por varios autores (Allaman, Bélanger, & Magistretti, 2011; Barros, Brown, & Swanson, 2018; Magistretti, 2010), donde se describe a los astrocitos como células principalmente glicolíticas y que aportan lactato a las neuronas para su metabolización a CO₂ en la mitocondrias. El metabolismo preferentemente glicolítico de los astrocitos, podría deberse a un estado más inactivo del PDHC (Halim et al., 2010) (ver más adelante y la figura 2), por lo que el piruvato no sería metabolizado a acetil-CoA y seguiría la vía de formación de lactato. Sin embargo, la utilización preferencial de lactato en las neuronas en lugar de glucosa en condiciones fisiológicas ha sido cuestionada (Dienel, 2017). Además, la inhibición mitocondrial en los astrocitos aumenta la vulnerabilidad de las neuronas corticales a la toxicidad mediada por glutamato (Voloboueva, Suh, Swanson, & Giffard, 2007), evidenciando que una adecuada función mitocondrial es necesaria para las actividades neuroprotectoras de los astrocitos.

3.5.2- Actividad bioenergética de la microglía. Las células de la microglía de ratón in situ expresan el complemento completo de genes necesarios para el metabolismo energético, tanto glucolítico como oxidativo, al igual que los astrocitos y las neuronas (Ghosh, Castillo, Frias, & Swanson, 2018; Zhang et al., 2014), aunque ello no necesariamente indica las tasas y rutas relativas del metabolismo energético que utiliza cada tipo celular. La microglía quiescente se basa fundamentalmente en la fosforilación oxidativa mitocondrial para la síntesis de ATP, mientras que la activación con mediadores proinflamatorios genera una reprogramación hacia un metabolismo más glicolítico, aumentando la captación de glucosa y la liberación de lactato (Gimeno-Bayón, López-López, Rodríguez, & Mahy, 2014; Voloboueva, Emery, Sun, & Giffard, 2013).

4- Antecedentes específicos y Dicloroacetato

En estudios previos de nuestro grupo, se demostró que la función neurotrófica habitual de los astrocitos espinales se reduce si son tratados con inhibidores de complejos de la CRM (P. Cassina et al., 2008).

Por otra parte, la neurotoxicidad de los astrocitos SOD1G93A se relaciona con un deterioro importante del consumo de oxígeno mitocondrial y el control respiratorio dependiente de ADP, asociado con una mayor formación de superóxido y daño nitro-oxidativo mitocondrial en comparación con los parámetros obtenidos de astrocitos nTg (P. Cassina et al., 2008). En concordancia, el tratamiento con mitoQ, un antioxidante dirigido a la mitocondria,

aumentó la supervivencia de las MNs en co-cultivo con astrocitos SOD1G93A (P. Cassina et al., 2008), y también en la médula espinal de los ratones SOD1G93A, mejorando además el desempeño motor y supervivencia de los animales (Miquel et al., 2014).

Otra estrategia que utilizamos para modular la neurotoxicidad de los astrocitos SOD1G93A fue estimular la respiración mitocondrial con **dicloroacetato (DCA)**.

El DCA es un análogo estructural del piruvato que ha sido previamente empleado en forma segura en humanos para el tratamiento de enfermedades mitocondriales congénitas (Abdelmalak et al., 2013; Stacpoole, Gilbert, et al., 2008) y modular metabolismo preferentemente glucolítico que presentan muchos tipos de cáncer aún en presencia de oxígeno (Stacpoole, 2017), conocido como efecto Warburg (Warburg, Wind, & Negelein, 1927). El DCA tiene las ventajas de que puede administrarse por vía oral, atraviesa la barrera hematoencefálica y es capaz ingresar a las células y a la matriz mitocondrial utilizando el sistema transportador de monocarboxilatos celular y de piruvato mitocondrial, respectivamente (James et al., 2017). Una vez en la matriz, el DCA inhibe la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) (Whitehouse, Cooper, & Randle, 1974), bloqueando el bolsillo de unión al piruvato y ADP, lo que interrumpe la unión de la quinasa al dominio lipoil (E2) del PDHC (Kato, Li, Chuang, & Chuang, 2007; J. Li, Kato, & Chuang, 2009) o en sitios alostéricos (Kato et al., 2007; Knoechel et al., 2006). La distintas isoformas de PDK regulan el metabolismo de la glucosa inactivando el PDHC (ver la figura 2) por fosforilación, de manera que éste permanece en su forma no fosforilada activa favoreciendo la conversión del piruvato en acetil coenzima A, el combustible principal del CK [revisión en (Jha, Jeon, & Suk, 2012)].

En nuestro trabajo previo, el DCA mejoró la función mitocondrial y redujo la proliferación en cultivos de astrocitos SOD1G93A y además evitó por completo su toxicidad sobre las MNs. Sumado a esto, la administración de DCA a ratones SOD1G93A redujo la pérdida de MNs y la astrogliosis en la médula espinal, lo que se reflejó en la mejora del rendimiento motor (medido por la fuerza de prensión) y en un aumento de la supervivencia de los animales (Miquel et al., 2012).

No existe información acerca de la función mitocondrial en las AbGCs, y dada su similitud con las células tumorales en algunos aspectos, resultaría interesante evaluar el efecto de modular su metabolismo con DCA. Tampoco hay datos sobre el efecto del DCA sobre la pérdida neuronal y la gliosis en la médula espinal de las ratas SOD1G93A.

5. ¿Existen células gliales aberrantes en los pacientes con la ELA?

En el análisis histológico de la médula espinal de las ratas transgénicas SOD1G93A, en estrecha relación con los somas de las motoneuronas en degeneración, se identifican células gliales hipertróficas que son positivas para los marcadores antes mencionados para las AbGCs, y marcadores de proliferación. Estas células, consistentemente se observan doble-marcadas para GFAP y S100 β , y aumentan en número con la progresión de la patología (Díaz-Amarilla et al., 2011). En relación a la posible presencia de células gliales aberrantes en el SNC de los pacientes con ELA, un reporte previo, el estudio neuropatológico de la médula espinal mostró células gliales hipertróficas positivas para S100 β en estrecho contacto con motoneuronas en degeneración (Migheli et al., 1999). Más recientemente, también en el asta ventral de la médula espinal de pacientes con ELA, se identificaron células hipertróficas, proliferantes aparentemente de estirpe microglial que expresan el marcador de células madre hematopoyéticas y progenitores CD34 (M. Kovacs et al., 2019). Estos datos son sugestivos de que es posible que existan células de tipo AbGCs en los pacientes con ELA, y sería interesante explorar su presencia y estudiar sus características.

Una fuente potencial para aislar este tipo de células aberrantes en individuos afectados por ELA podría ser el líquido céfalo raquídeo (LCR). La racionalidad de esta posibilidad se basa en las características similares de las AbGCs con las células tumorales que comentamos antes.

Las células de tumores del SNC primarios o metastásicos, pueden infiltrar el líquido cefalorraquídeo (LCR) por diversas vías que incluyen la invasión directa de la piamadre en el caso de los de situados superficialmente, o por diseminación a lo largo de los espacios perivasculares de Virchow-Robin en aquellos de localización más profunda (Mammoser & Groves, 2010; Weston, Glantz, & Connor, 2011). De forma similar o desde el espacio perivascular en los plexos coroideos, pueden también llegar al LCR células inflamatorias que han infiltrado el SNC (Gherzi-Egea et al., 2018). El estudio citológico del LCR obtenido por punción lumbar permite la evaluación de los tipos celulares presentes en el mismo con fines diagnósticos en diversas patologías como la hemorragia subaracnoidea y los procesos infecciosos o tumorales (Rahimi & Woehrer, 2018). En el caso de los tumores, la especificidad del análisis citológico es muy alta pero no así su sensibilidad, por lo que las células obtenidas pueden ser cultivadas para observar su crecimiento (Glantz et al., 1998; X. Li et al., 2018), y tanto en las células frescas o cultivadas analizar marcadores tumorales, ya sea para diagnóstico o seguimiento (X. Li et al., 2018; A. M. Miller et al., 2019; Rahimi & Woehrer, 2018; Weston et al., 2011). Con este mismo criterio, y dadas las características mencionadas previamente, las AbGCs podrían ser identificadas en el LCR, y de esta forma,

el LCR podría transformarse en una fuente accesible a este tipo celular con fuertes implicancias diagnósticas y/o terapéuticas.

Los antecedentes expuestos destacan la participación de los astrocitos y microglía en la neuroinflamación y muerte neuronal en la ELA y el papel determinante que tiene la función mitocondrial en el fenotipo de estas células. Se expone además que las AbGCs muestran altísima neurotoxicidad, además de una elevada actividad proliferativa y otras características que las hacen semejantes a las células tumorales. Por otra parte, se ha reportado el pasaje de células tumorales o inflamatorias al LCR. Tomados en conjunto, estos datos permiten el planteo de las siguientes hipótesis de trabajo.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

- 1) *La actividad mitocondrial juega un rol determinante en el fenotipo neurotóxico-inflamatorio de las células gliales aberrantes de la médula espinal en el modelo de las ratas SOD1G93A.*
- 2) *El líquido cefalorraquídeo de los individuos afectados por ELA puede ser una fuente de células aberrantes o reactivas similares a las identificadas en el modelo animal.*

Objetivos:

Objetivo general:

- 1) Evaluar los efectos de la modulación mitocondrial en la determinación del fenotipo de las células gliales aberrantes (AbGCs) que contribuyen a la neurodegeneración en la ELA.
- 2) Explorar la presencia de células similares a las AbGCs en el LCR de individuos afectados con ELA

Objetivos específicos:

1. Caracterizar la funcionalidad mitocondrial de las AbGCs en cultivo.
2. Evaluar el efecto del DCA sobre aspectos fenotípicos de las AbGCs en cultivo.
3. Analizar si el tratamiento con DCA *in vivo* provoca cambios en la histopatología de la médula espinal de las ratas SOD1G93A.
4. Estudiar el LCR de individuos con ELA y controles para evaluar la posibilidad de obtener células para cultivo.

Estrategia de investigación y actividades específicas

Para el abordaje de los objetivos específicos 1 a 3 se utilizaron animales de experimentación, en particular ratas transgénicas SOD1G93A y ratas control no transgénicas; se realizaron experimentos en cultivos de células gliales y motoneuronas, y ensayos con tratamientos *in vivo*.

Objetivo 1:

Se realizaron cultivos de astrocitos espinales a partir de la médula espinal de neonatos de ratas nTg y SOD1G93A y de AbGCs a partir de ratas adultas SOD1G93A. Se estudió la morfología mitocondrial utilizando sondas mitocondriales fluorescentes y microscopía confocal, y se evaluaron parámetros morfológicos cualitativos y cuantitativos, estos últimos con la ayuda de las herramientas básicas y plugins del programa ImageJ. Se analizó la función mitocondrial mediante respirometría de alta resolución (HRR) en células intactas estudiando el consumo de oxígeno y sus cambios en respuesta a la adición de compuestos que afectan la función de componentes específicos de la cadena respiratoria y la síntesis de ATP. Los parámetros funcionales y morfológicos obtenidos se compararon entre los 3 tipos de células gliales.

Objetivo 2:

Para evaluar el efecto del DCA sobre el fenotipo de las AbGCs, se realizaron experimentos en cultivo con un grupo control tratado con el vehículo y otro tratado con el fármaco. En estos se estudió y comparó:

- a- la función mitocondrial por HRR como para el objetivo 1.
- b- el crecimiento poblacional mediante conteos celulares a diferentes tiempos luego de sembradas las células y la capacidad proliferativa cuantificando la incorporación de BrDU.
- c- la expresión de moléculas marcadoras por inmunofluorescencia.
- d- la capacidad neurotóxica, analizando la supervivencia de motoneuronas en dos aproximaciones: 1) cultivos puros de motoneuronas expuestos a medio condicionado proveniente de cultivos de AbGCs pretratadas con DCA o vehículo, y 2) co-cultivos de motoneuronas con AbGCs pretratadas con DCA o vehículo

Objetivo 3:

Para analizar si el tratamiento con DCA *in vivo* provoca cambios en la histopatología de la médula espinal de las ratas SOD1G93A se realizó un ensayo con 3 grupos de ratas hembra:

1) SOD1G93A tratado con DCA, 2) SOD1 G93A control (vehículo) 3) no transgénicas control (emparejadas por edad con los otros grupos). El DCA se administró en el agua de beber a partir del inicio de los síntomas durante 10 días tras lo cual los animales se fijaron por perfusión y se procesó la médula espinal para el estudio de marcadores de tipos celulares.

Objetivo 4.

Para el abordaje del objetivo 4 se analizaron muestras de LCR de individuos afectados con ELA y controles. Las muestras se centrifugaron a la velocidad habitual para sedimentar componentes celulares, y el sedimento se cultivó en condiciones similares a las utilizadas para las células gliales. En los cultivos obtenidos se estudió la expresión de marcadores celulares por inmunofluorescencia, y en uno de los casos el efecto del DCA sobre la morfología mitocondrial.

Materiales y Métodos

Materiales

Los medios de cultivo y el suero fetal bovino y suero de caballo para suplementar los medios de cultivo fueron de Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los frascos y placas de cultivo fueron de Nunc (Thermo Fisher Scientific). El DCA y todos los demás reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich a menos que se especifique lo contrario. Los datos de los anticuerpos utilizados se proporcionan en la [Tabla 1](#).

Tabla 1. Lista de anticuerpos utilizados para inmunocitofluorescencia, inmunocitoquímica e inmunohistofluorescencia

Antígeno detectado	Especie, tipo,	Conj.	Dilución	Vendedor, #Cat	RRID
b III Tubulin	Rb, P	---	1:3000	Abcam, ab18207	AB_444319
BrDU	Mo, M	---	1:1000	Sigma-Aldrich, B2531	AB_476793
Cx-43	Rb, P	---	1:250 ^a	Thermo Fisher Scientific, 71-0700	AB_2533973
GFAP	Rb, P	---	1:400	Sigma-Aldrich, G9269	AB_477035
GLT-1	Rb, P	---	1:200 (5µg/ml)	Abcam, ab41621	AB_941782
GS	Rb, P	---	1:10000	Abcam, ab49873	AB_880241
Iba1	Rb, P	---	1:1000	Wako, 019-19741	AB_2665520
NeuN	Rb, P	---	1:1000	Millipore, ABN78	AB_10807945
NG2	Rb, P	---	1:300	Millipore, AB5320	AB_11213678
S100β	Mo, M	---	1:400	Sigma-Aldrich, S2532	AB_477499
vimentin	Mo, M	---	1:50	Sigma-Aldrich, V6389	AB_609914
Mo IgG	Go, P	AF488	1:1,000 ^b	Thermo Fisher Scientific, A-11029	AB_138404
Rb IgG	Go, P	HRP	1:5,000	Thermo Fisher Scientific, 31460	AB_228341
Rb IgG	Go, P	AF488	1:1,000 ^a	Thermo Fisher Scientific, A-11034	AB_2576217
Rb IgG	Go, P	AF594	1:1,000 ^c	Thermo Fisher Scientific, A-11037	AB_2534095

#Cat: número de catálogo; RRID: Research Resource Identifier;

BrDU: bromodeoxyuridine; Cx-43: Connexin 43; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLT-1: glutamate transporter 1; GS: glutamine synthase; NG2: NG2 chondroitin sulfate proteoglycan; Go: goat; Mo: mouse; Rb: rabbit; IgG: Immunoglobulin G

Animales

Las ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague Dawley salvaje y machos hemicigotos NTac:SD-Tg(SOD1G93A)L26H fueron adquiridas en Taconic (Hudson, NY, USA) y se formó una colonia actualmente alojada en la Unidad de Reactivos Biológicos y de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina. Se dispusieron hasta 6 animales machos o hembras por

jaula, con un ciclo luz-oscuridad de 12 hs con acceso *ad libitum* a alimentos y agua. Los cruzamientos se realizaron entre machos hemicigotos y hembras no transgénicas. La progenie se genotipó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en una muestra de la cola, como se describió anteriormente (Vargas et al., 2005). Tanto el inicio de los síntomas (160–170 días) como la esperanza de vida (180–195 días) en nuestra colonia se retrasaron considerablemente en comparación con el reporte original (Howland et al., 2002). Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo a los protocolos internacionales para el tratamiento de animales de experimentación y los determinados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), protocolo # 070153-000528-14.

Neonatos y embriones de rata para cultivos celulares: las ratas no transgénicas adultas en fase proestro de ciclo estral determinado por el análisis microscópico de la población celular del exudado vaginal, se mantuvieron durante 24 hs con un macho transgénico SOD1G93A (para obtener neonatos para cultivo de astrocitos), o con un macho no transgénico (para obtener embriones para el cultivo de MNs). Los neonatos fueron genotipados el día del nacimiento (P0) mediante PCR y el cultivo de astrocitos se realizó al día siguiente (P1); los embriones para el cultivo de MNs fueron obtenidos en la mañana del día embrionario 14 (E14.5).

Pacientes

Las muestras de pacientes y controles se obtuvieron en el marco del proyecto “Identificación de astrocitos aberrantes con capacidad neurotóxica en pacientes portadores de Esclerosis Lateral Amiotrófica”, que propone realizar una prueba de concepto con el objetivo de explorar la presencia de células con fenotipo aberrante en el líquido cefalorraquídeo de 3 pacientes con ELA definida y de 3 pacientes Control, sin ELA. En los individuos control, la obtención del LCR se realizó en el marco de su proceso asistencial por la patología motivo de consulta, con indicación de punción lumbar con fines diagnósticos o terapéuticos por parte del médico tratante. Para su selección se tomaron como criterios de exclusión los planteos diagnósticos de enfermedades inflamatorias o degenerativas del SNC distintas de la ELA como por ejemplo meningitis o meningoencefalitis viral o bacteriana, enfermedad inflamatoria autoinmune, neurosífilis, poliradiculoneuropatías inflamatorias, enfermedad de Parkinson, síndrome demencial y otras enfermedades motoneuronales. Los pacientes fueron captados en las consultas de control en la policlínica de Neurología del Hospital de Clínicas, donde funciona el CELAU (Centro de ELA del Uruguay). Se explicó a los pacientes todos los aspectos del estudio y de su participación en el mismo: objetivos, procedimientos a realizarle, riesgos inherentes al procedimiento y beneficios potenciales, directos e indirectos, y se solicitó la firma de consentimiento informado específico. Tanto el proyecto como los formularios de consentimiento informado (segunda Versión con fecha 21/9/2014) fueron

aprobados por la Comisión Honoraria Asesora del Instituto Nacional de Donación y Trasplante de Células, Tejidos y Órganos (INDT) (fecha de aprobación 25/03/2015).

Cultivos celulares

Medios de cultivo: Para el cultivo de astrocitos neonatales, AbGCs y células de LCR humano el medio de cultivo utilizado fue Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) alto en glucosa (4.5 g/l), sin piruvato, suplementado con HEPES 3.6 g/l, penicilina 100 UI/ml, estreptomina 100 mg/ml y 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) (medio s-DMEM). Para los co-cultivos de glía con MNs se utilizó medio de Leibovitz L15 suplementado con bicarbonato de sodio 0.63 mg/ml, insulina 5 µg/ml, conalbúmina 0.1 mg/ml, putrescina 0.1 mM, selenito de sodio 30 nM, progesterona 20 nM, glucosa 20 mM y 2% (v/v) de suero de caballo (HS) (medio s-L15). Para los cultivos de MNs purificadas el medio fue Neurobasal suplementado con L-glutamato 25 µM, β-mercaptoetanol 25 µM, L-glutamina 0,5 mM, suplemento B-27 y HS al 2% (v/v) (medio s-NB).

Cultivos de astrocitos de la médula espinal de ratas neonatales: Los neonatos de rata fueron genotipados el día del nacimiento y los cultivos se obtuvieron al día siguiente (P1) según el protocolo de Saneto y de Vellis (Saneto & De Vellis, 1987) con menores modificaciones como describimos previamente (P. Cassina et al., 2002; Pehar et al., 2002). Se disecó de 4 a 10 médulas espinales de los neonatos en cada preparación, se liberaron de las meninges y se cortaron en fragmentos que se incubaron con tripsina 0.25% (25 min a 37°C). La tripsinización se detuvo con medio s-DMEM en presencia de 50 µg/ml de DNasa I. Después de la disgregación mecánica por pipeteo repetido, la suspensión se pasó a través de una malla de 80 µm y se centrifugó 10 min a 300g. El pellet se resuspendió en medio s-DMEM y se plaqueó a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células por botella de cultivo de 25 cm². Cuando llegaron a confluencia (7 días), los cultivos se agitaron durante 48 hs a 250 rpm para purificación de los astrocitos y se incubaron durante otras 48 hs con 10 µM de arabinósido de citosina para eliminación de células proliferantes. Luego de 48 hs adicionales se sembraron a una densidad de 2×10^4 células/cm² en placas de 4 pocillos para co-cultivos o preparación de medios condicionados (CM), frascos 25 cm² para estudios de respirometría, o cámaras de cubreobjetos LabTek para estudios de microscopía confocal. Las preparaciones de transgénicos y no transgénicos de la misma camada se procesaron en paralelo, y los experimentos se realizaron en el primer pasaje.

Cultivos de células gliales aberrantes: Las AbGCs se obtuvieron de las médulas espinales de ratas SOD1G93A adultas sintomáticas (160– 165 días; 4 machos, 2 hembras; con ambas extremidades posteriores parálíticas) de acuerdo con los procedimientos descritos previamente (Díaz-Amarilla et al., 2011). Los animales fueron sacrificados por anestesia profunda y la médula espinal fue disecada en hielo. Las meninges se eliminaron

cuidadosamente y el resto del procedimiento fue similar al descrito para los cultivos de astrocitos neonatales. Debido a que grandes cantidades de lípidos impiden el recuento celular, la totalidad de las células aisladas de cada médula espinal individual se colocaron en 1 frasco de cultivo de 25 cm². El s-DMEM se reemplazó cada 48 hs hasta obtener confluencia (aproximadamente 3 semanas) y el cultivo confluyente se tripsinizó para su resembrado en las mismas condiciones explicadas anteriormente (a una densidad de 1×10^6 células por 25 cm²) cada semana. Entre los pasajes 3 a 8, las AbGCs confluentes fueron tripsinizadas y resuspendidas en FBS-10% dimetil-sulfóxido (DMSO) para su criopreservación. En cada conjunto de experimentos se utilizaron AbGCs de al menos 3 ratas en los pasajes 6 a 12 como fue descrito previamente (Díaz-Amarilla et al., 2011), que se sembraron en la placa o frasco de cultivo adecuado en forma similar a la descrita para los astrocitos neonatales.

Cultivos de motoneuronas: Las preparaciones de MNs se obtuvieron de la médula espinal de embriones de rata no transgénicos de 15 días de gestación (E14.5) como se ha descrito previamente (P. Cassina et al., 2008, 2002). Se disecó la médula espinal de los embriones y se liberaron de las meninges y de los sectores medulares dorsales; los sectores ventrales se fraccionaron y tripsinizaron (0.05%, 15 minutos a 37°C). La disociación se completó mecánicamente y las células se aislaron por gradiente de densidad con Optiprep (Sigma). Se seleccionaron mediante inmunopanning con anti-p75 usando como anticuerpo el sobrenadante del hibridoma IgG192 contra el receptor de baja afinidad para las neurotrofinas p75 (Chandler, Parsons, Hosang, & Shooter, 1984) gentilmente cedido por el Dr. C.E. Henderson, (CNRS-INSERM-Francia). Las MNs se sembraron a una densidad de 300 células/cm² sobre cultivos confluentes de células gliales (feeder layers, FL) en medio s-L15 o sobre sustrato de poliornitina-laminina en medio s-NB suplementado con factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF, 1 ng/ml) como se describió anteriormente (P. Cassina et al., 2002; Díaz-Amarilla et al., 2011). En todos los experimentos se utilizó un grupo sin tratar con GDNF como condición de muerte y control intra-experimento, mientras que la condición con GDNF se usó como control de supervivencia y normalización.

Cultivos de células de LCR humano: El LCR se obtuvo por punción lumbar (PL) con el procedimiento utilizado en la práctica médica habitual del Instituto de Neurología del Hospital de Clínicas en la policlínica, bajo condiciones estériles estándares de asepsia. Se utilizó catéter tipo Abbocath 18 o 20G y se recogió el LCR (1,5-10 ml) en tubos plásticos de centrífuga estériles de 15 ml que fueron trasladados en forma refrigerada para ser procesados de forma inmediata al Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular del Depto de Histología y Embriología.

El LCR fue centrifugado a 500 g durante 10 minutos, el sobrenadante se descartó. El pellet se resuspendió en 500-1000 µl de s-DMEM, se sembró en uno o 2 pocillos de las placas de

4 y se incubó en estufa de CO₂ a 37°C. Se reemplazó el medio cada 48-72 hs y se hizo seguimiento por microscopía de contraste de fases (CF), constatándose la presencia de células en algunos de ellos. Se obtuvieron imágenes con CF en los momentos de cambio de medio.

Accedimos a 2 muestras control (Ctrl1 y Ctrl2) y 2 de pacientes (ELA1 y ELA2) cuyas características se presentan en la sección Resultados. Con la segunda muestra de paciente con ELA se pudo llegar a realizar pasajes para expandir las células y algunos cultivos fueron criopreservados en forma similar a las AbGCs en FBS-10% DMSO. Algunos experimentos fueron realizados en los cultivos primarios. Para la muestra ELA2 utilizamos los pasajes 2 a 5 iniciales y también luego de ser descongeladas en pasajes mayores.

Cultivos de células IMR-90: los fibroblastos humanos de pulmón (ATCC® CCL-186; ATCC, Manassas, Virginia, USA) se cultivaron en s-DMEM y se utilizaron en pasaje 10 como controles para la inmunofluorescencia en células de LCR humanas.

Tratamiento de cultivos y preparación de medio condicionado

La solución stock de DCA 1M se preparó con agua destilada y se adicionó directamente a los cultivos celulares a una dilución 1:200 y concentración final 5 mM (Miquel et al., 2012). El tratamiento se aplicó sobre monocapas de AbGCs confluentes en s-DMEM y se mantuvo crónicamente durante 6 días, reemplazando el medio y el DCA cada dos días, a menos que se especifique otro protocolo. Para la preparación del medio condicionado (MC) de astrocitos o AbGCs, las células tratadas con DCA o con vehículo fueron lavadas con buffer fosfato salino Dulbecco (DPBS) tibio y se añadió medio s-L15 fresco sin el tratamiento. Al mismo tiempo, se colocó medio s-L15 en una placa sin células en el incubador para usarlo como control (Ctrl). El medio condicionado de las células pre-tratadas y el s-L15 incubado sin células fue colectado después de 24 hs y centrifugado para eliminar los detritos previo a su utilización.

Inmunofluorescencia en cultivo

Las células tratadas con DCA o vehículo se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en DPBS pH = 7,4 durante 15 minutos en hielo; se permeabilizaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con 0,1% de Triton X-100 en DPBS; se bloquearon con DPBS conteniendo 10% de suero de cabra, 2% de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.1% de Triton X-100 durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios diluidos en 0,1% Triton X-100 en DPBS. Después del lavado, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados a la especie del primario utilizado conjugados con el fluorocromo Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594. En algunos casos, los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen, número

de catálogo D1306). Para la inmunofluorescencia en células del LCR humano los pasajes fueron entre 0 y 5 (ver resultados), y usamos cultivos primarios de astrocitos de médula espinal de rata nTg y una línea de fibroblastos humanos de pulmón (IMR-90) como controles para los marcadores.

Las imágenes se obtuvieron usando una cámara digital (Olympus DP-71) acoplada a un microscopio invertido de epifluorescencia (Olympus IX81) o mediante microscopía confocal (microscopio TCS-SP5 II, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Tratamiento de las motoneuronas y estudio de supervivencia

En los cultivos de MNs puros, los tratamientos se realizaron luego de 24 hs de sembradas en s-NB con GDNF. El DCA o vehículo se adicionaron a una dilución 1:200 (5 mM final). Los MC de glía pre-tratada con DCA o vehículo, o s-L15 preincubado sin células se adicionaron a una dilución 1:100 (Díaz-Amarilla et al., 2011).

Los co-cultivos con glía pre-tratada con DCA o vehículo se mantuvieron durante 48 hs y luego se fijaron (4% de PFA más 0,1% de glutaraldehído en DPBS, 15 min a temperatura ambiente) y procesaron para detección del marcador beta-III-tubulina por inmunocitoquímica. El procesamiento fue similar al utilizado para la inmunofluorescencia, pero utilizando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y revelado con 3,3'-diaminobencidina.

La supervivencia de las MNs se evaluó mediante recuento directo de las células con neuritas de longitud igual o mayor a 4 veces el diámetro del soma en un área prefijada de un centímetro cuadrado. Las sembradas sobre sustrato se contaron vivas bajo microscopio de contraste de fases y las de los co-cultivos, inmunorreactivas para beta-III-tubulina mediante luz transmitida convencional utilizando un microscopio Nikon Eclipse TE 200 (P. Cassina et al., 2002; Díaz-Amarilla et al., 2011).

Estudio de la morfología mitocondrial

Las células fueron sembradas en cámaras de cubreobjetos LabTek y tratadas con DCA o vehículo por 6 días. Las células del LCR se utilizaron en pasaje 9. Luego del tratamiento se incubaron con MitoTracker Green FM o MitoTracker Deep Red FM 100 nM (Invitrogen, número de catálogo M7514 y M22426 respectivamente) durante 30 minutos en DMEM sin FBS como indica el fabricante, se lavaron y se adicionó s-DMEM. Se visualizaron por microscopía confocal usando un objetivo de inmersión en aceite HCX PL APOx63/1.40-0.60 y los láseres 488 o 633 respectivamente. Se obtuvieron grupos de imágenes apiladas en el eje z (stacks) con un paso de 0.5 μm entre las imágenes a partir de 4 campos de cada cámara del LabTek. Las imágenes se procesaron y analizaron usando las herramientas del software Fiji (NIH; RRID: SCR_002285). Se realizó una proyección máxima en el eje z de

cada stack y se trabajó con las imágenes en 2 dimensiones. En el procesamiento se utilizaron algunas herramientas de deconvolución, que incluyeron un filtro “find edges” o un filtro pasabanda (límites 40px/2px). Para las células gliales la longitud mitocondrial se midió manualmente con las líneas rectas o segmentadas de las herramientas básicas del programa; se analizaron al menos 10 células por grupo a partir de 2 experimentos, y se midieron al menos 280 mitocondrias por célula. Para las células del LCR, luego del filtro pasabanda, se recortaron manualmente 12 células por grupo y sobre las imágenes de las células aisladas se realizó una segmentación (binarización y esqueletización), que genera un esqueleto lineal equidistante de los bordes de los objetos presentes en la imagen (las mitocondrias en este caso). Sobre las imágenes esqueletizadas se aplicó el plugin “AnalyzeSkeleton (2D/3D)”, que genera datos para cada objeto, y permite clasificarlos, como se puede ver en la figura [16.B](#) de la sección Resultados. Estos datos incluyen el número de píxeles que contactan con 2 píxeles (correspondientes a segmentos lineales del esqueleto, slabs, anaranjados en la figura 16.B), los que contactan con más de 2 píxeles (puntos de unión entre segmentos, magenta en la figura 16.B) y los que contactan con menos de 2 (azules en la figura 16.B). Entre estos últimos están los que contactan con 1 solo píxel o píxeles terminales en los extremos de los slabs, y los que no contactan con ninguno, estructuras cuyas dimensiones en el espacio son iguales (Arganda-Carreras, Fernández-González, Muñoz-Barrutia, & Ortiz-De-Solorzano, 2010) y que los asumimos como puntiformes, basándonos en la observación de la imagen no procesada. Estos datos permiten estudiar varios aspectos de cada objeto como su longitud, el número de ramificaciones (segmentos lineales) y puntos de unión (que lo procesa y brinda el mismo plugin) que son muy útiles para el análisis de la red mitocondrial (Valente, Maddalena, Robb, Moradi, & Stuart, 2017). A partir de los datos obtenidos clasificamos las mitocondrias en 3 grupos: 1) **puncta**: puntiformes, con 1 solo píxel; 2) **filamentos**: con 2 píxeles terminales, n lineales, y ninguno de ramificación; 3) **ramificadas**, con n píxeles terminales, n lineales, y n de ramificación, siendo n distinto de cero. Una limitante de la metodología es que para las mitocondrias puntiformes, al estar representadas por un solo píxel (px, corresponde a 0.12 μm en nuestras imágenes), no es posible identificar variaciones en sus dimensiones, y su longitud promedio es de 1 px, mientras que la longitud total que se muestra en la figura [16.F](#), y que aporta a la sumatoria de longitudes en la figura [16.D](#), es igual al número de mitocondrias de este tipo. Pasa algo similar con los extremos de las mitocondrias filamentosas y de las ramificaciones de las reticulares. Debido a estas limitaciones preferimos mantener los datos de dimensiones en píxeles para la descripción.

Estudio de la función mitocondrial

Utilizamos el equipo Oxygraph 2 K (Oroboros Instruments Corp) que permite estudios de respirometría de alta resolución (HRR). El equipo cuenta con dos cámaras con electrodos de Clark que son calibrados a 37°C (21% de O₂ en el aire; [O₂]=260 μM disuelto en el agua). Después del tratamiento crónico con DCA o vehículo, las monocapas gliales se rasparon, resuspendieron en 2,2 ml de s-DMEM (1 x10⁶ células/ml) y se colocaron en una de las cámaras. El estudio se realizó con las células intactas, a 37°C en su propio medio de cultivo habitual. El consumo de oxígeno y la tasa de consumo (del inglés oxygen consumption rate, OCR) se registró simultáneamente mediante el software de análisis DatLab 4 y se expresó como pmol O₂. ml⁻¹. s⁻¹.

El protocolo de los experimentos se realizó como se reportó previamente (Gnaiger, 2012; Miquel et al., 2012), y consistió en los siguientes pasos de registro de OCR de la muestra: 1) inicial (“routine” o basal) en medio de cultivo sin la adición de sustratos o inhibidores. 2) adición de oligomicina (oligo; 2 μM final) para inhibir la ATP sintasa; 3) titulación con carbonyl cyanide p- trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP, 0.5 μM cada vez), que transporta protones a través de la MM disipando el gradiente y desacoplando la cadena de transporte de electrones de la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa); 4) adición de antimicina A (AA; 2.5 μM final), un inhibidor del CIII, para bloquear el transporte de electrones y así discriminar el consumo y la tasa de consumo de oxígeno no mitocondrial.

Luego de restar el valor de la pendiente en presencia de AA, determinamos los siguientes parámetros e índices, que nos muestran el estado funcional de la mitocondria (Brand & Nicholls, 2011), los cuales se pueden visualizar en la figura [3.A](#) (sección Resultados):

- 1) **Respiración mitocondrial basal**, valor de OCR de las células en las condiciones basales.
- 2) **Respiración mitocondrial no acoplada a la síntesis de ATP**, valor de OCR luego de inhibir la ATP sintasa con oligomicina, corresponde en su mayor parte a la fuga de protones (FP).
- 3) **Respiración mitocondrial acoplada a la producción de ATP**, OCR sensible a oligomicina: se calcula restando el valor de OCR obtenido luego de adicionar oligomicina al OCR basal.
- 4) **Respiración mitocondrial máxima**, máximo consumo de oxígeno en presencia de FCCP (RMax).
- 5) **Capacidad respiratoria de reserva**: se obtiene de restar a la RMax el consumo de oxígeno basal; aporta información de la capacidad de respuesta que puede tener la célula frente a un aumento de requerimientos (CRes).

6) **Eficiencia de acoplamiento**, un índice calculado como la respiración mitocondrial acoplada a la síntesis de ATP dividido por el basal: ATP/basal. Da información sobre el grado de acoplamiento mitocondrial en las condiciones basales de las células.

6) **Índice de control respiratorio celular (RCR)**, para este protocolo con células intactas, lo calculamos como: RMax/Respiración no acoplada a la producción de ATP (FP). Este índice de RCR celular tiene las mismas 2 ventajas principales que la eficiencia de acoplamiento en mitocondrias aisladas, que son la sensibilidad a varios sitios potenciales de disfunción y la normalización interna, independiente de variables como la cantidad de células. Es un buen marcador de disfunción mitocondrial en este protocolo, ya que depende de casi todos los aspectos funcionales de la fosforilación oxidativa (Brand & Nicholls, 2011).

Estudio del crecimiento y la proliferación celular

Las AbGCs se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de $1,2 \times 10^4$ células/cm² en s-DMEM. El DCA o vehículo se añadió 3 hs después de sembradas, y tanto el medio como el tratamiento, se reemplazaron cada dos días. Después de 1, 2, 3, 6 u 8 días desde el sembrado, se cosecharon grupos independientes de células mediante tripsinización y se contaron en una cámara de Neubauer.

Para estudios de incorporación de bromodeoxiuridina (BrDU), luego de 48 hs de sembrados, los cultivos fueron tratados con BrDU 10 μ M durante 6 h y fijados (PFA 4%, 15 min). Se incubaron con ácido clorhídrico (1 N; 30 min, 37°C) para hidrolizar el ADN y permitir el acceso de los anticuerpos, se procesaron para la detección de BrDU por inmunofluorescencia y los núcleos totales se tiñeron con DAPI como describimos antes. Se obtuvieron diez imágenes por placa con un aumento de 20x en microscopio de epifluorescencia. Las células teñidas con DAPI y BrDU se contaron usando la herramienta análisis de partículas del Fiji y el plugin Cell counter, respectivamente. La proliferación se expresó como células inmunorreactivas BrDU por cada 100 núcleos teñidos con DAPI como en (Miquel et al., 2012).

Medida de la concentración de lactato y glucosa

Las AbGC se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de 2×10^4 células/cm². Se añadió DCA o vehículo después de alcanzar la confluencia; el medio y tratamientos se reemplazaron a los 2 y 4 días. Al séptimo día, el medio de las AbGCs tratadas con DCA o vehículo, y de placas sin células incubadas el mismo período (72 hs) se recolectó, se centrifugó para eliminar detritos y se almacenó a -20°C. La concentración de lactato y glucosa se determinó en las muestras descongeladas el mismo día mediante un analizador automático de cultivo celular (Bioprofile Basic 2, Nova Biomedical, Waltham, MA). Los valores de las mediciones obtenidas del s-DMEM libre de células se restaron de todos los

datos del medio acondicionado celular en cada experimento. Los datos se expresan en miligramos por litro corregido por número de células.

Administración de DCA a los animales y estudios de inmunofluorescencia en la médula espinal.

El tratamiento de las ratas se comenzó al inicio de los síntomas. Se utilizaron hembras debido a su manipulación más sencilla y la mayor disponibilidad, dado que los machos SOD1G93A positivos se destinan como reproductores para el mantenimiento de la colonia. Las hembras SOD1G93A y nTg fueron seguidas con control de peso y de actividad motora dos veces por semana desde los 90 días de edad. El inicio de la enfermedad se determinó para cada animal cuando la atrofia muscular pronunciada se acompañó de una marcha anormal, expresada por arrastre sutil de 1 extremidad posterior. Se incluyeron 10 animales SOD1G93A, asignando de cada camada a los 2 grupos experimentales siguientes: 1) SOD1G93A DCA y 2) SOD1G93A Control, n=5 por grupo. Los animales que iniciaron síntomas delanteros no se incluyeron en el experimento. Otros grupos fueron de hembras nTg sin tratar con DCA (nTg, n=5) o tratadas (nTg DCA, n=4) apareadas en edad con las nTg. El DCA se preparó fresco a una concentración de 500 mg/l en agua corriente y se cambió dos veces por semana; los grupos control recibieron el agua corriente habitual. El volumen total consumido se midió para garantizar una dosis diaria constante de 100 mg/kg (en base a una ingesta diaria de 50 ml) como se reportó anteriormente para ratones (Andreassen et al., 2001; Miquel et al., 2012).

Después de 10 días de tratamiento, los animales recibieron anestesia profunda por sobredosis intraperitoneal de ketamina/xilazina (90 y 10 mg/kg respectivamente) y se realizó perfusión intracardíaca con solución salina al 0,9% seguida de PFA al 4% en DPBS 0,1 M, pH 7,4. Se disecó la médula espinal lumbar y se postfijó por inmersión durante 24 hs en el mismo fijador; se crioprotegió en solución de sacarosa al 30% en DPBS y se realizaron secciones transversales (30 μ m) en un crióstato Leica. La inmunofluorescencia se realizó en flotación. Se permeabilizó durante 30 minutos (0.3% Triton X-100 en DPBS); se bloqueó con suero de cabra al 10%, BSA al 2% y Triton X-100 al 0,3% durante 1 h, y se incubó durante la noche o 48 h con los anticuerpos primarios para NeuN, Iba1, o doble marcado para GFAP más S100 β , diluidos en 0.3% Triton X-100 PBS. Después del lavado, las secciones se incubaron en anticuerpos secundarios apropiados a la especie del primario utilizado, conjugados con los fluorocromos Alexa Fluor 488 o 594. Se obtuvieron stacks de imágenes (con el mismo número y tamaño de paso) e imágenes de 1 plano con un aumento de 40x en el microscopio confocal utilizando los mismos parámetros de exposición para todas las secciones.

Análisis de las imágenes: Las imágenes se analizaron utilizando el software Fiji en forma ciega al tratamiento. Para la cuantificación de la inmunorreactividad para GFAP e Iba1, el asta ventral se delimitó en imágenes de escala de grises no procesadas de al menos 8 secciones no adyacentes por animal y se midió el valor medio de grises (mean gray value). Para el conteo celular se usó el plugin Cell Counter. En imágenes de secciones de doble inmunofluorescencia para GFAP y S100 β (al menos 10 secciones no adyacentes por animal) se contaron todas las células gliales hipertróficas doblemente marcadas presentes en el asta ventral. Para el conteo y medida del diámetro de las MNs, se usaron las herramientas básicas del Fiji (perímetro lineal) en imágenes individuales de al menos 15 secciones no adyacentes por animal inmunomarcadas para NeuN.

Presentación de resultados y análisis de datos

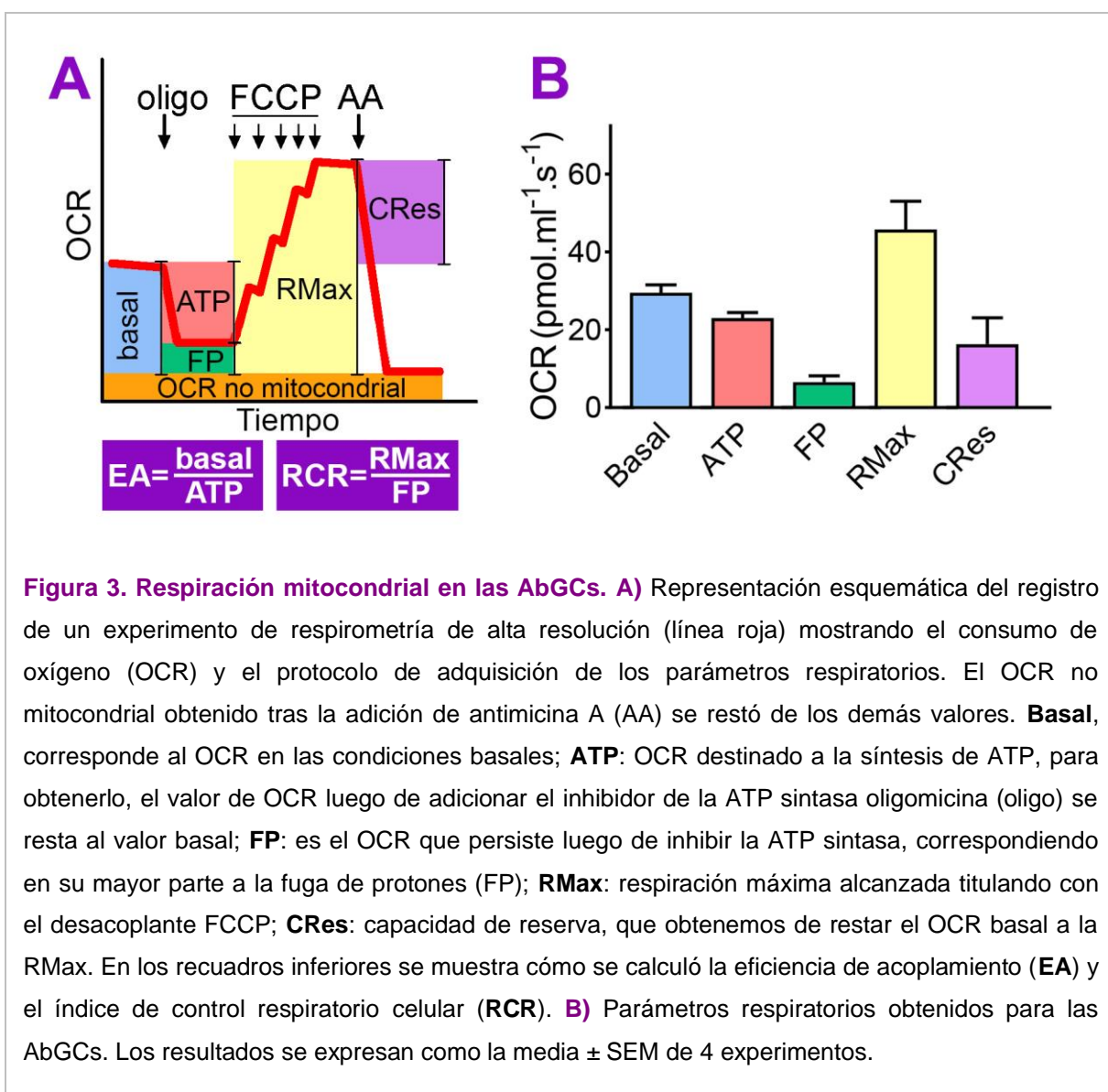
El software Adobe Photoshop CS6 (RRID: SCR_014199) se usó para procesar imágenes y para diseñar figuras. El software GraphPad Prism 8 (RRID: SCR_015807) se utilizó para diseñar gráficos de figuras y análisis de datos. Los datos de los experimentos de cultivo se presentan como la media \pm SEM de valores obtenidos de al menos 3 cultivos independientes realizados por duplicados o por triplicados. Todos los datos obtenidos fueron utilizados para el análisis estadístico. Las comparaciones entre 2 conjuntos de datos se realizaron mediante la prueba t apareado (apareando valores dentro de los experimentos) con 1 cola. Para comparar más de 2 grupos se utilizó ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple de Newman-Keuls. El análisis de correlación entre medias se realizó suponiendo una distribución gaussiana de los datos para obtener el coeficiente de Pearson r y r^2 . Para comparar las curvas de crecimiento entre células tratadas con DCA y con vehículo se realizó ANOVA de dos vías seguido de posttest de Bonferroni. Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la red mitocondrial de las células de LCR, utilizamos prueba t sin aparear, y dado que no aparentaba a priori ninguna diferencia, la opción fue con 2 colas. Para comparar el efecto del tratamiento sobre grupos diferentes de mitocondrias se utilizó ANOVA de 2 vías seguido del test de Holm-Sidak para la comparación múltiple entre los grupos.

Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0.05$; los valores de n , p , t y F se proporcionan según corresponda en las figuras y/o sus leyendas.

Resultados

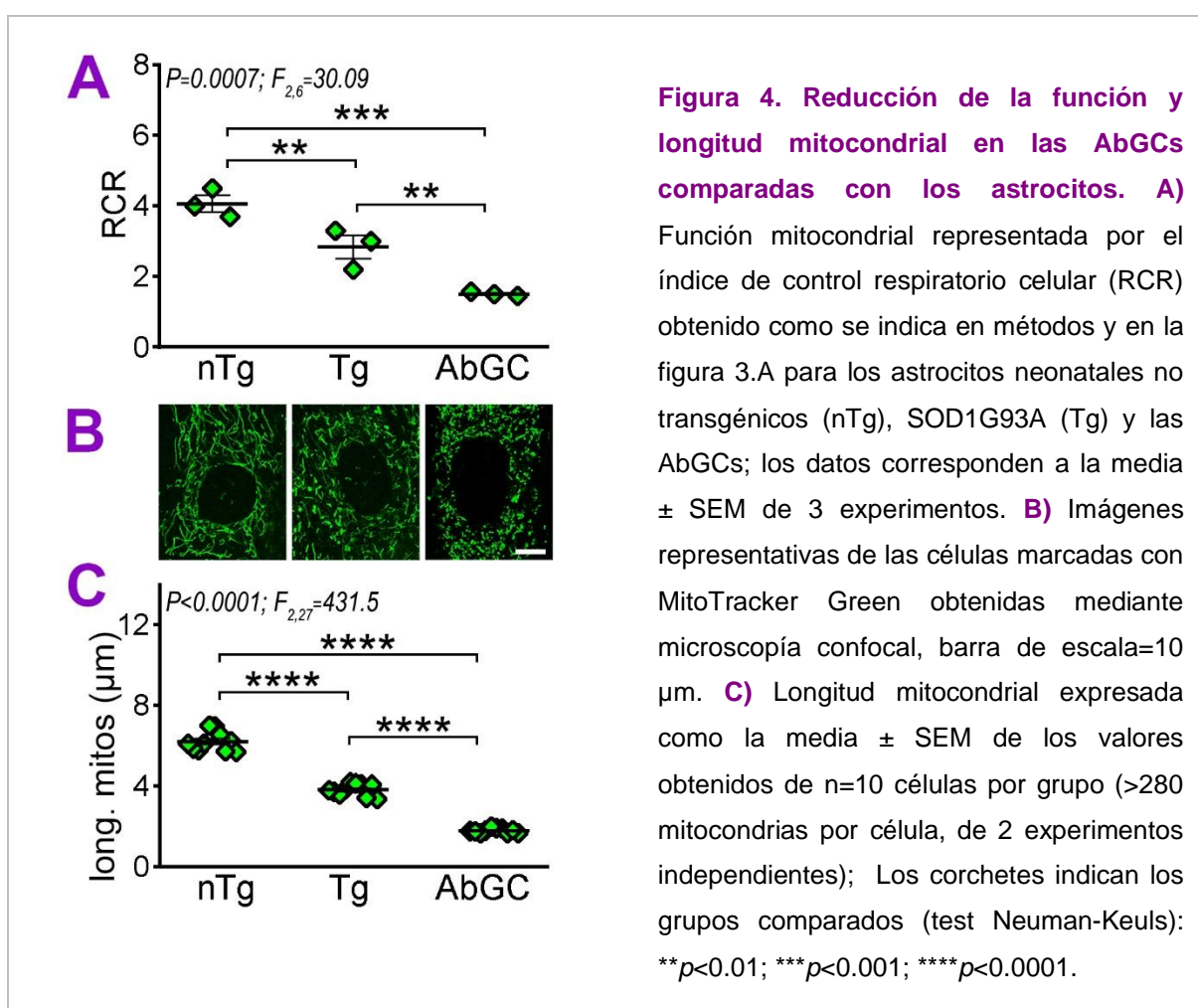
La función respiratoria y la longitud mitocondrial son menores en las células gliales portadoras de la SOD1G93A

Dado que la neurotoxicidad de los astrocitos SOD1G93A se asocia a una actividad mitocondrial más baja con respecto a los astrocitos neonatales no transgénicos (P. Cassina et al., 2008; Miquel et al., 2012), nos preguntamos si ocurría algo similar con el fenotipo neurotóxico de las AbGCs. Para ello, realizamos estudios de HRR.



La figura 3.A muestra un diagrama del OCR en función de tiempo indicando los sustratos y drogas adicionadas, así como los parámetros e índices obtenidos (ver en métodos y en la leyenda de la figura).

Los parámetros respiratorios obtenidos para las AbGCs se presentan en la figura 3.B. Utilizando muestras de 1×10^6 células/ml del medio de cultivo celular habitual, luego de restar el OCR que persiste en presencia de AA, las AbGCs presentaron un OCR basal de 29.5 ± 2.04 pmoles. $\text{ml}^{-1}.\text{s}^{-1}$. El OCR destinado a la síntesis de ATP, fue de 23.0 ± 1.42 pmoles. $\text{ml}^{-1}.\text{s}^{-1}$, correspondiente a 78 % del basal, mientras que el OCR por FP fue de 6.5 ± 1.62 (22% del basal). Con la adición de FCCP se logró una RMax de 45.8 ± 7.22 pmoles. $\text{ml}^{-1}.\text{s}^{-1}$, por lo que la CRes de las AbGCs obtenida de restar a la RMax el OCR basal, fue de 16.3 ± 6.80 pmoles. $\text{ml}^{-1}.\text{s}^{-1}$.



Para comparar la funcionalidad mitocondrial de las AbGCs con la de los astrocitos SOD1G93A y salvajes utilizamos el RCR celular (razón RMax/FP). Este índice fue menor en los astrocitos neonatales SOD1G93A en comparación con los astrocitos nTg como hemos reportado anteriormente (Miquel et al., 2012). Las AbGCs obtenidas de la médula espinal de

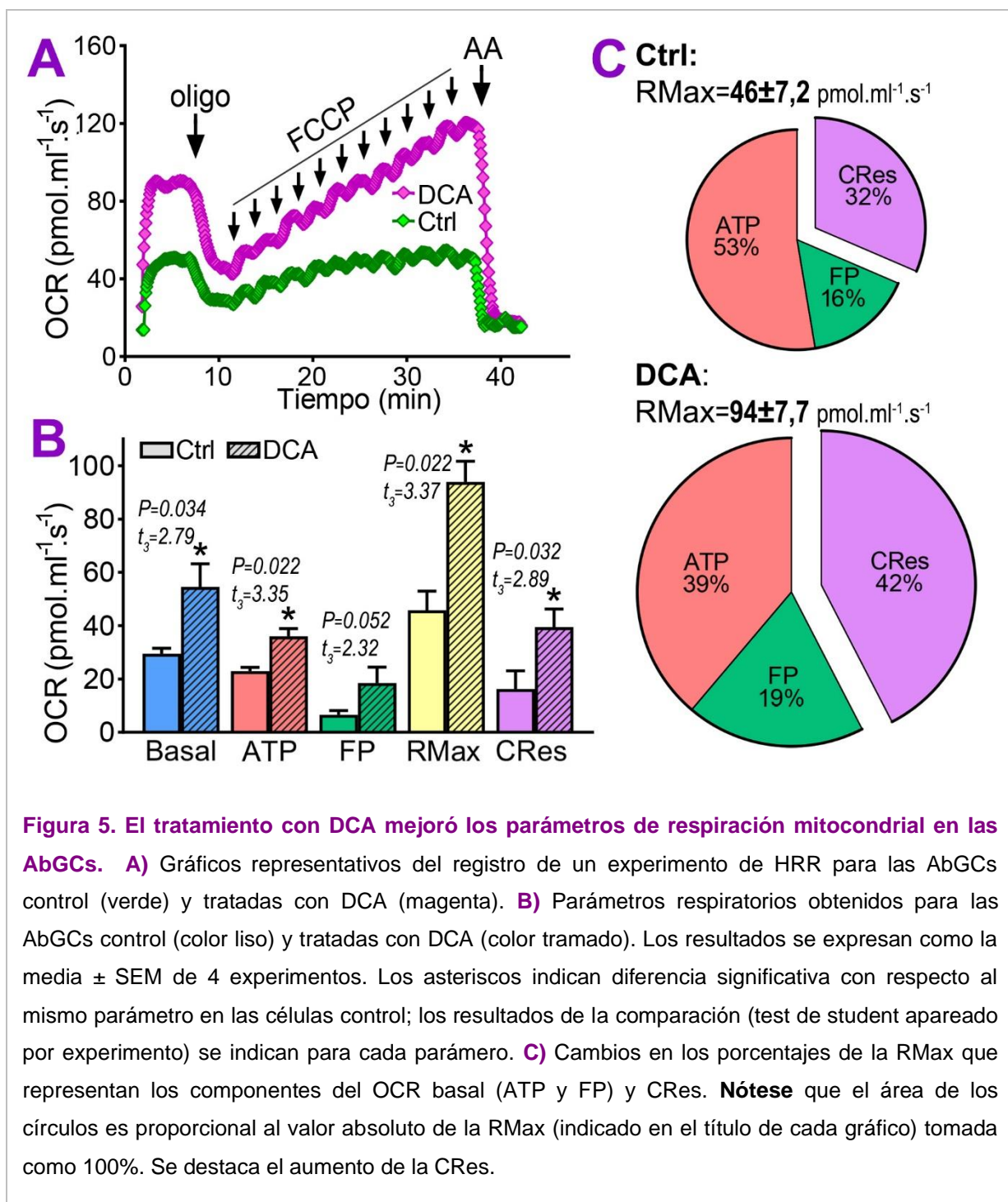
ratas adultas sintomáticas exhibieron un RCR celular aún más reducido en comparación con los astrocitos SOD1G93A como se muestra en la figura [4.A](#).

Con el fin de relacionar la función respiratoria con la morfología de la red mitocondrial observamos cultivos de células gliales incubadas con Mitotracker Green por microscopía confocal. Las características morfológicas mitocondriales variaron entre los 3 tipos de células gliales como se muestra en la figura [4.B](#). La mayoría de las mitocondrias de las AbGCs eran estructuras pequeñas, puntiformes y de apariencia fragmentada en comparación con la morfología de la red de filamentos exhibida por los astrocitos nTg. Se encontraron formas intermedias en los astrocitos SOD1G93A. La longitud mitocondrial media fue significativamente diferente entre los 3 grupos, siendo muy reducida en las AbGCs ($1.8 \pm 0.04 \mu\text{m}$) en comparación con los astrocitos SOD1G93A ($3.9 \pm 0.10 \mu\text{m}$) y nTg ($6.2 \pm 0.15 \mu\text{m}$) (figura [4.C](#)). La comparación de las medias entre el RCR celular y la longitud mitocondrial mostró una correlación positiva entre las 2 variables (Pearson, $r = 0.9977$; $r^2 = 0.9954$; $p = 0,0216$). Además, en base a los datos previamente publicados sobre la supervivencia de las MNs en co-cultivos con los tres tipos de células gliales (Díaz-Amarilla et al., 2011; Miquel et al., 2012), la capacidad de la glía para soporte trófico de las MNs también se correlaciona positivamente con la función mitocondrial que encontramos (Pearson, $r = 0.9971$; $r^2 = 0.9941$; $p = 0,0216$).

La modulación metabólica con DCA mejoró la respiración mitocondrial en las células gliales aberrantes y disminuyó el lactato extracelular

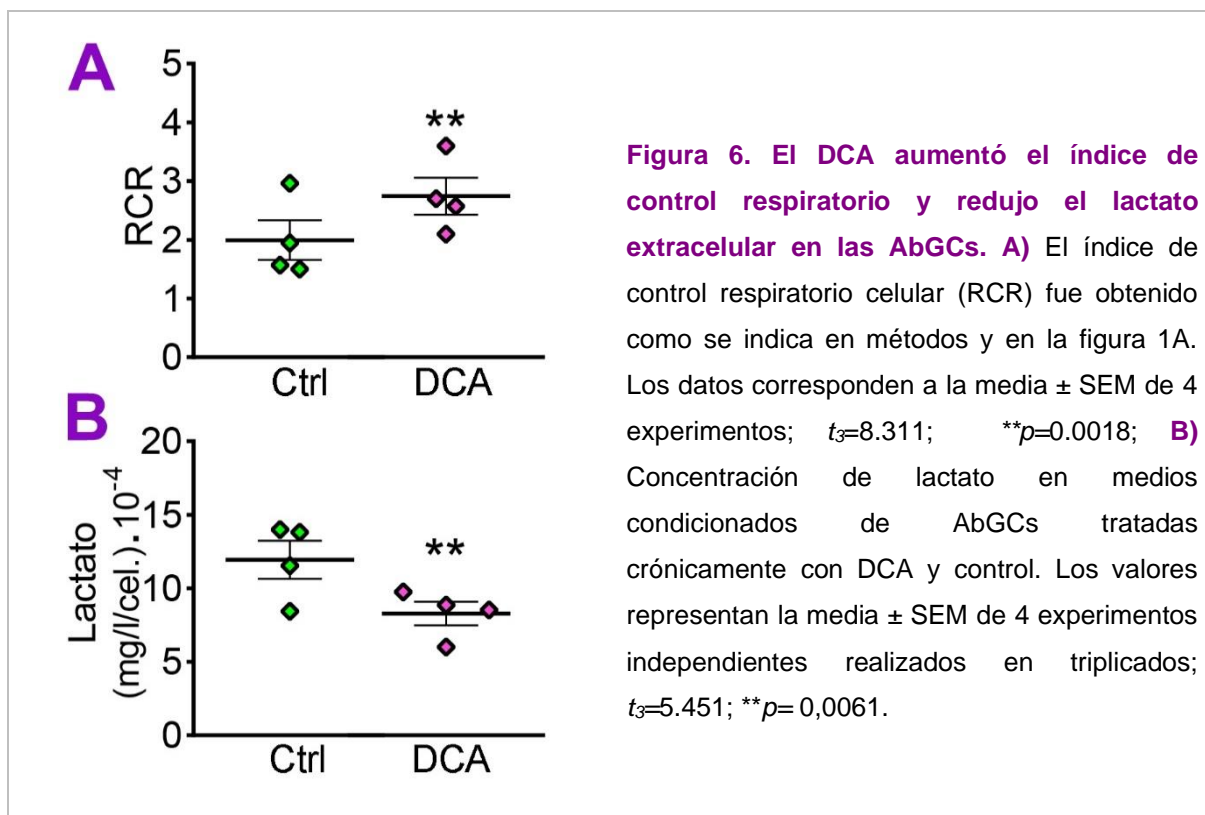
Para estudiar si la modulación metabólica podría mejorar la respiración mitocondrial de las AbGCs, tratamos los cultivos confluentes con DCA o vehículo durante 6 días y evaluamos la actividad mitocondrial mediante HRR al final del período de tratamiento. La figura [5.A](#) muestra un gráfico representativo del registro de OCR de las células control y tratadas.

El OCR basal fue mayor en las AbGCs que recibieron tratamiento crónico con DCA, al igual que la respiración sensible a oligomicina relacionada con la producción de ATP y su capacidad para responder al estímulo con FCCP (figura [5.B.C](#)). De hecho, el valor mayor de OCR basal y el destinado a la producción de ATP corresponde a una menor proporción de la RMax en las células tratadas y por lo tanto a una mayor CRes que aumentó un 10 % (figura [5.B.C](#)). Sin embargo, los valores de OCR relacionados a la FP no alcanzaron una diferencia significativa entre las células tratadas y las control ($n=4$, $p = 0.052$, $t_3=2.317$; figura [5.B](#)).



El DCA no modificó la eficiencia de acoplamiento (relación entre el ATP y el basal), que fue de 0.73 ± 0.069 para el control y 0.69 ± 0.065 ; $n=4$; $p=0.077$; $t_3=1.894$. Sin embargo, provocó una mejora en el RCR, que como se muestra en la figura 6.A, fue significativamente mayor en las AbGCs expuestas al fármaco en comparación con el control. Estos resultados indican una mejora del estado funcional mitocondrial inducida por el tratamiento. Además, como es de esperar por la inhibición de la PDK, encontramos una reducción significativa en la concentración de lactato en los medios de cultivo de las AbGC después del tratamiento

crónico con DCA (figura 6.B). Por otro lado, la concentración de glucosa en el medio de cultivo no cambió luego del tratamiento (17.9 ± 3.74 vs $17.4 \pm 3.50 \times 10^{-4}$ mg/l/número de células; control vs DCA respectivamente; prueba de t de dos colas; $n = 4$; $p = 0.719$; $t_3 = 0.395$), indicando que las modificaciones descritas no se deben a un aumento en la incorporación de glucosa a la célula.

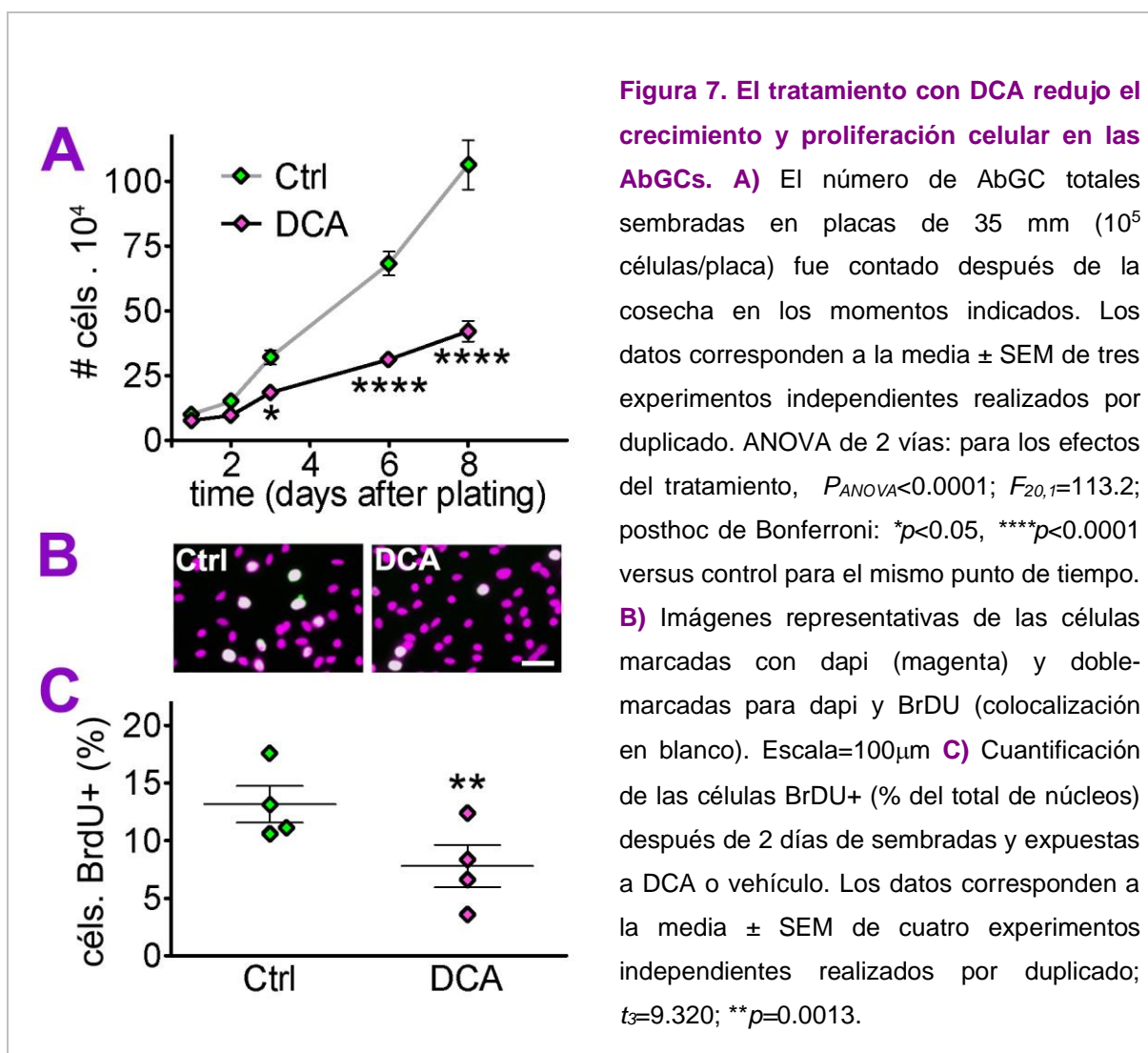


La modulación metabólica con DCA redujo el crecimiento y proliferación de las células aberrantes

Una de las características biológicas más relevantes de este tipo celular consiste en su alta capacidad proliferativa (Díaz-Amarilla et al., 2011). Cuando las AbGCs se expusieron a DCA 5 mM desde el día 0 después de sembradas, ocurrió una reducción de la tasa de crecimiento celular. La exposición a DCA disminuyó significativamente el número de células presentes en las placas a los 2 a 8 días después del plaqueo (figura 7.A).

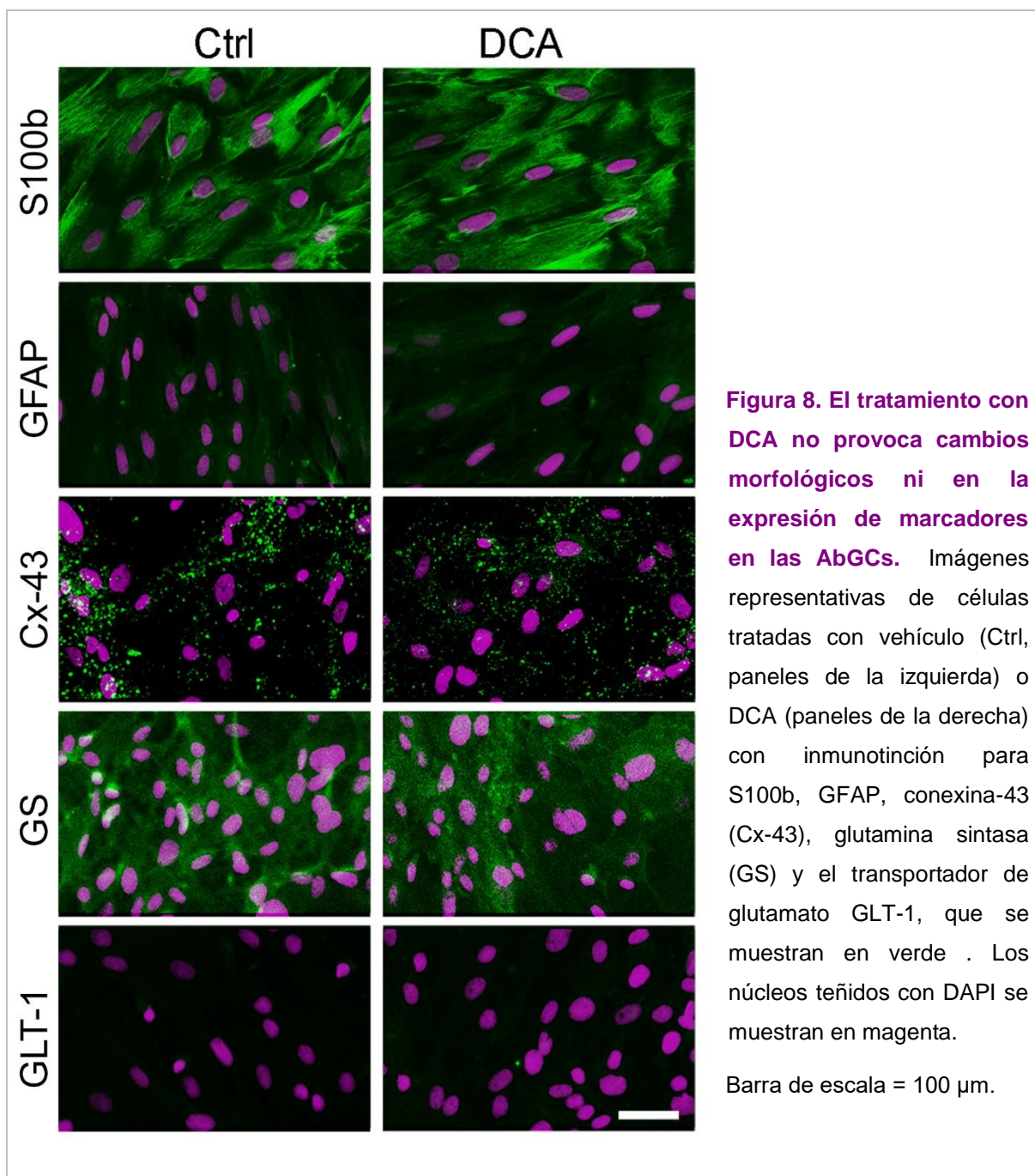
Para evaluar la proliferación, luego de 48 hs de sembradas, las células se expusieron a BrDU durante 6 hs, las fijamos y realizamos su inmunodetección. En el grupo de tratamiento con DCA se observó una disminución de las células marcadas (figura 7.B), y la cuantificación mostró una reducción significativa del porcentaje de células positivas para BrDU con respecto al total marcadas con DAPI (figura 7.C).

Por otra parte, cuando estudiamos el efecto del tratamiento crónico con DCA sobre cultivos confluentes, no se modificó el número de AbGCs adheridas a las placas (control $592.0 \pm 11.27 \times 10^3$; DCA $604.3 \pm 16.76 \times 10^3$; test de t de dos colas apareado; $n = 3$; $p = 0.664$; $t_2 = 0.504$) ni tampoco aquellas despegadas posiblemente no viables presentes en el medio (control $9.0 \pm 0.31 \times 10^3$; DCA $9.2 \pm 0.50 \times 10^3$; prueba de t de dos colas; $n = 3$; $p = 0.816$; $t_2 = 0.264$).



En relación con otros aspectos fenotípicos, el tratamiento crónico con DCA no modificó las características morfológicas o la expresión de los marcadores de AbGCs previamente descritos analizados por inmunofluorescencia. Tanto el vehículo como las células tratadas con DCA exhibieron: (a) una alta inmunoreactividad para S100 β , mostrando un patrón fibrilar, (b) una inmunotinción con GFAP baja, perinuclear y no fibrilar, (c) una distribución típica puntiforme de Cx-43, (d) una marcación citosólica moderada de glutamina sintasa

(GS), y (e) ausencia de inmunoreactividad para el transportador de glutamato-1 (GLT-1) (figura 8).

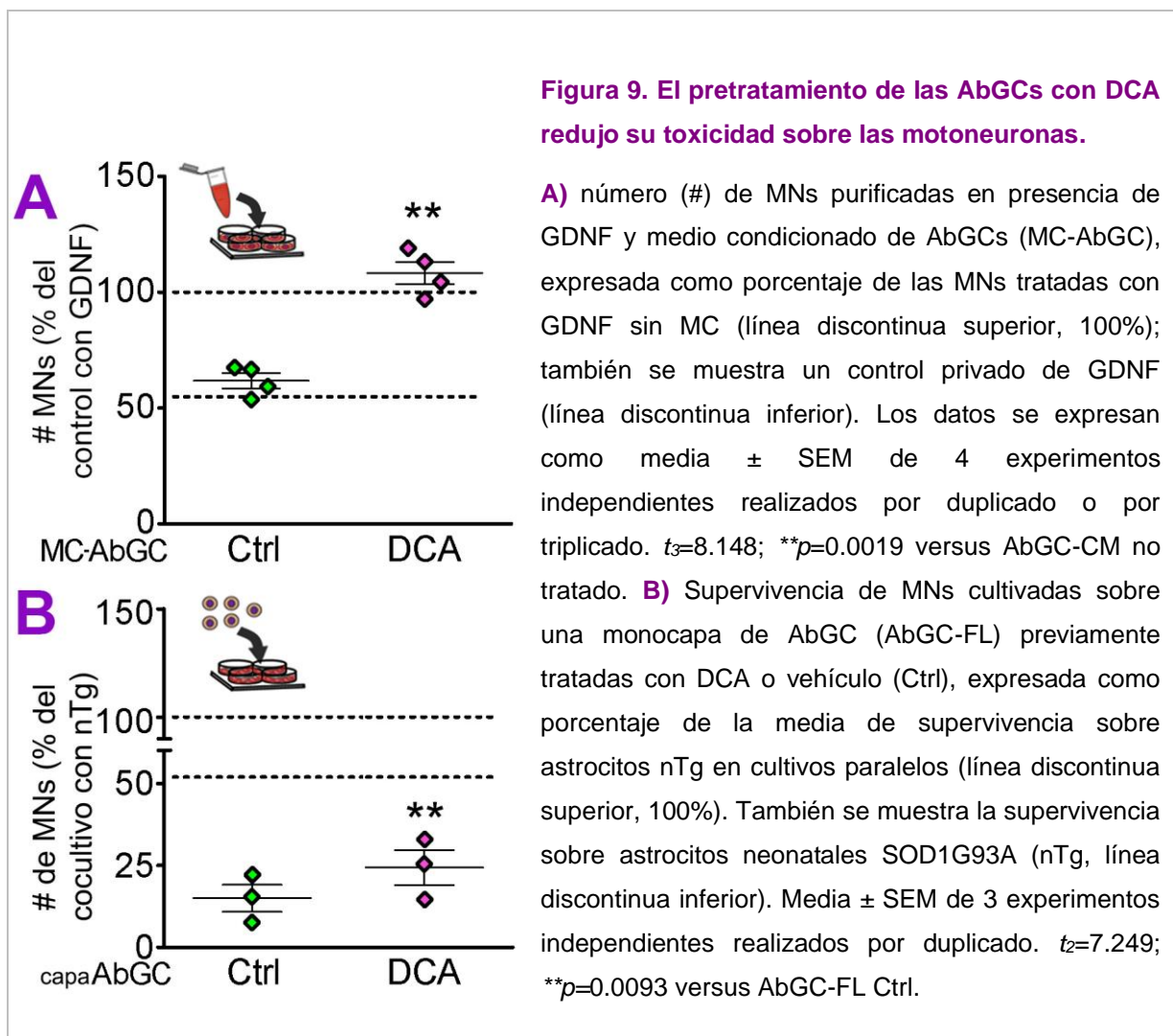


La modulación metabólica con DCA redujo la toxicidad de las células gliales aberrantes

Para evaluar el efecto de la modulación metabólica sobre la actividad neurotóxica de las AbGCs utilizamos 2 aproximaciones: el estudio del medio condicionado sobre cultivos purificados de MNs aisladas y co-cultivos de AbGCs y MNs. A los cultivos purificados de MNs los tratamos con medios condicionados de AbGCs previamente tratadas con DCA o

vehículo. Como reportamos previamente (Díaz-Amarilla et al., 2011), el medio condicionado de las AbGCs (dilución 1: 100) fue tóxico para los cultivos puros de MNs en presencia de GDNF en comparación con los cultivos control, reduciendo el número de células al nivel mostrado en la condición de privación de factor trófico (figura 9.A). El efecto tóxico fue evitado por el tratamiento crónico de las AbGCs con DCA antes de la recolección del medio condicionado (figura 9.A).

Para evaluar posibles efectos directos del DCA sobre MNs, las incubamos con DCA a la misma concentración utilizada para las AbGCs (5 mM) en presencia de GDNF durante 48 h. En estas condiciones, el tratamiento no modificó la supervivencia de las MNs (44.9 ± 2.36 en cultivos expuestos a GDNF y 45.3 ± 3.38 en cultivos expuestos a GDNF más DCA; $n=3$,



prueba t de 2 colas, $p=0.439$; $t_2=0.1713$).

En segundo lugar, realizamos experimentos de co-cultivo de AbGCs previamente expuestas a DCA o vehículo con MNs y evaluamos la supervivencia de estas últimas. Encontramos que el efecto altamente tóxico de las AbGCs previamente demostrado en condiciones de co-cultivo (Díaz-Amarilla et al., 2011), pudo prevenirse parcialmente mediante el pretratamiento

con DCA (figura [9.B](#)). La supervivencia neuronal después de 3 días en cultivo sobre una monocapa de AbGCs fue muy escasa (15% considerando como 100% la supervivencia neuronal alcanzada en co-cultivo con astrocitos nTg neonatales, línea discontinua superior en figura [9.B](#)). Cuando las AbGC se expusieron crónicamente a DCA antes del sembrado de las MNs, la supervivencia neuronal, aunque todavía baja, aumentó significativamente (en un 62%) en comparación con los no tratados.

Evaluación de células gliales aberrantes, neuroinflamación y neurodegeneración en ratas SOD1G93A

Hemos demostrado previamente que en ratones SOD1G93A, el tratamiento con DCA mejoró la supervivencia y la fuerza de agarre, además de reducir la astrogliosis en la médula espinal (Miquel et al., 2012). Nuestro objetivo aquí fue investigar si el tratamiento con DCA también sería capaz de modificar la histopatología de la médula espinal en degeneración en el modelo de la rata transgénica SOD1G93A. Administramos DCA (v/o, 500 mg/l en agua corriente, 100 mg/kg/día) a ratas SOD1G93A desde el inicio de los síntomas por un período de 10 días. Los grupos de ratas SOD1G93A tratadas con DCA y con vehículo fueron similares en peso corporal al inicio del tratamiento, y el tratamiento no produjo diferencias en este parámetro ([Tabla 2](#)).

Tabla 2. Peso corporal de las ratas SOD1G93A utilizadas en el estudio

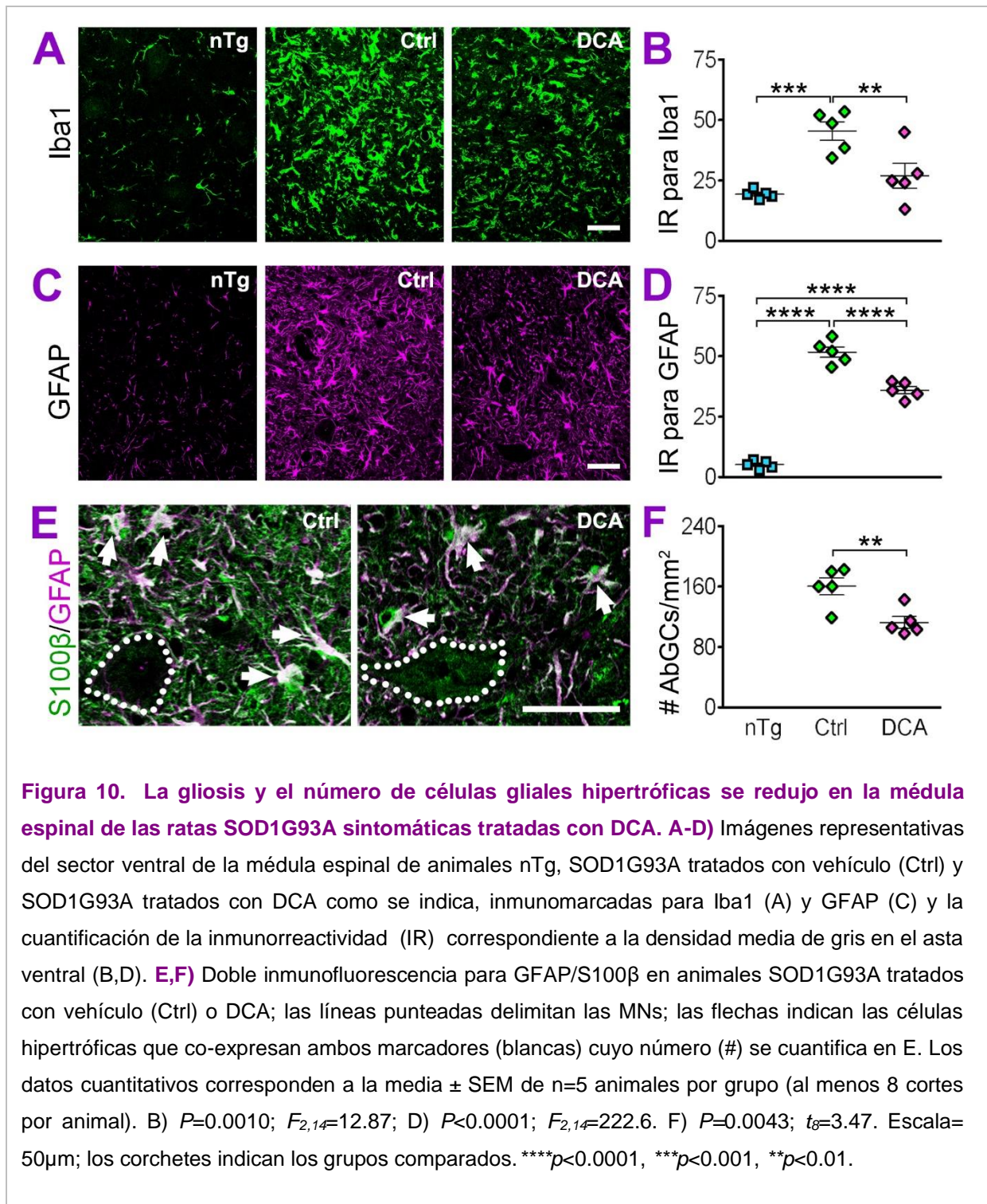
	Valor \pm SEM (g)		P	t_8	significación
	Ctrl	DCA			
Inicio	286 \pm 7.8	279 \pm 10.8	0.606	0.538	ns
final	276 \pm 3.6	274 \pm 11.0	0.902	0.128	ns

Como se describió previamente (Graber, Hickey, & Harris, 2010; Howland et al., 2002), los animales transgénicos presentaron aumento de la inmunorreactividad para los marcadores de microglía (Iba1; figura [10.A,B](#)) y astrocitos (GFAP; figura [10.C,D](#)) en el asta ventral de la médula espinal.

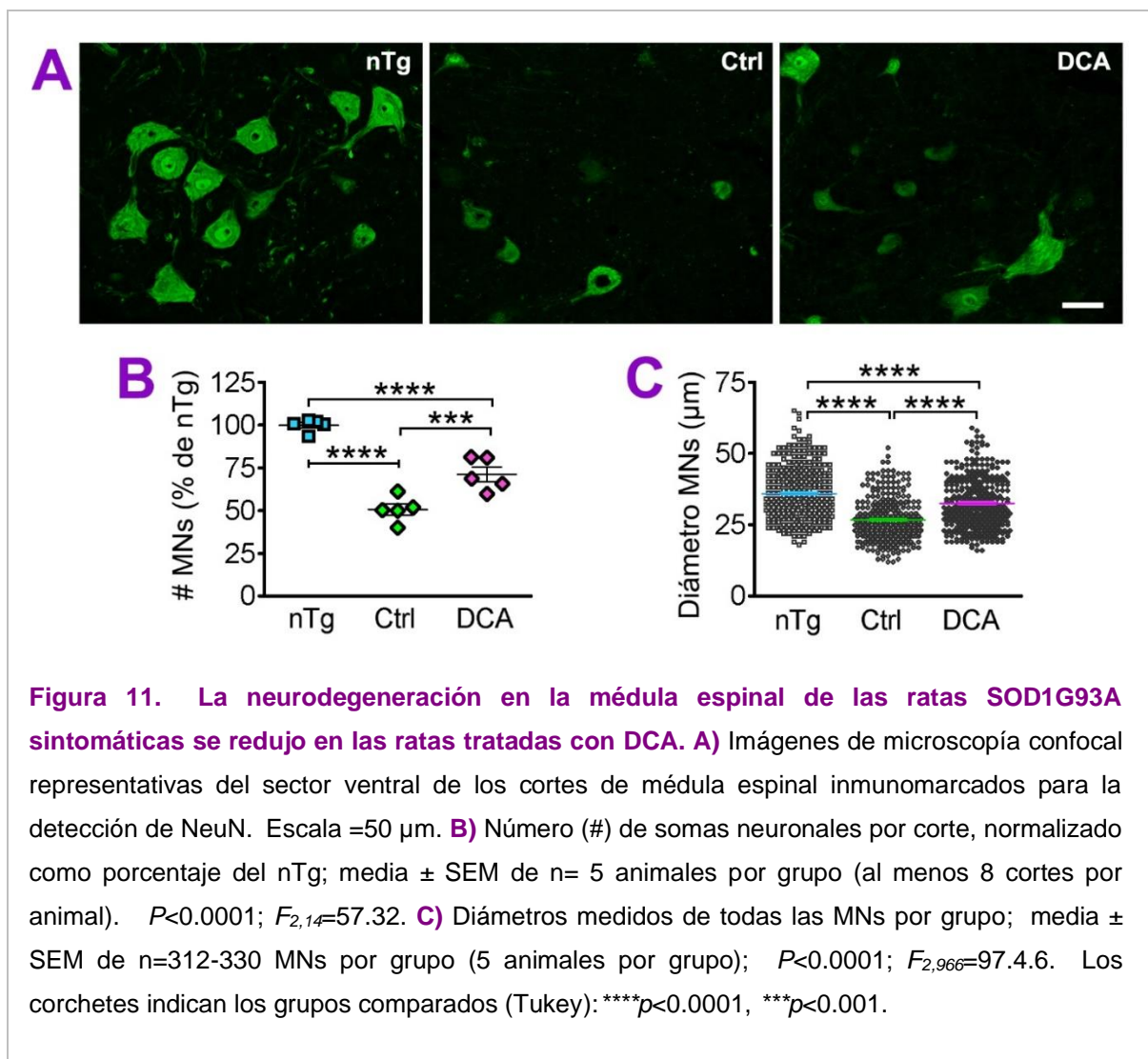
La administración de DCA redujo significativamente la inmunorreactividad contra GFAP e Iba1 en la médula espinal de los animales tratados. Además, observamos la presencia de las células hipertróficas doblemente marcadas para GFAP y S100 β (flechas en la figura [10.E](#)) símil-AbGCs (Díaz-Amarilla et al., 2011), las cuales no se detectan en los animales

nTg. En los animales tratados con DCA el número de AbGCs fue significativamente menor que en los animales tratados con vehículo (figura [10.F](#)).

Para evaluar la neurodegeneración, cuantificamos el número de somas de MNs en el asta ventral de la médula marcados con inmunofluorescencia para NeuN (figura [11.A](#)). En los animales SOD1G93A que recibieron vehículo la media del número de somas por corte fue de 4.24 ± 0.269 luego de 10 días de iniciados los síntomas, lo que significa una reducción de casi 50% respecto a los animales nTg de la misma edad en los cuales la media fue de $8.36 \pm 0,147$. En los animales que recibieron tratamiento con DCA, se observó un mayor número MNs que en los tratados con vehículo, con una media por corte de 5.98 ± 0.358 somas. En la figura [11.B](#) se muestra un gráfico con la cuantificación del número de somas neuronales por corte de médula espinal expresados como porcentaje del valor encontrado en los animales nTg.



En la neurodegeneración, además de la reducción del número de MNs se puede observar que los somas remanentes son más pequeños (figura 11.A). Se midió el diámetro mayor de cada MN, y se compararon los 3 grupos. Las diferencias en el diámetro son significativas; el diámetro mayor promedio por animal de las neuronas fue de $35.9 \pm 0.51 \mu\text{m}$ en los nTg, $26.7 \pm 0.42 \mu\text{m}$ en los SOD1G93A y $32.5 \pm 0.51 \mu\text{m}$ en los SOD1G93A tratados con DCA ($F_{2,12}=6,493$; ANOVA $P=0.012$). Si consideramos el pool total de MNs por grupo obtenemos los datos que se muestran en la figura 11.C.



Identificación de glías aberrantes en individuos portadores de ELA

Debido a la similitud entre la biología de las AbGCs y las células tumorales es que nos propusimos investigar la presencia de células del SNC en el LCR de pacientes. Los individuos afectados por ELA fueron contactados en el CELAU como se indica en métodos.

Al momento actual contamos con resultados de 2 pacientes y 2 controles, cuyos datos y características muestrales se resumen en la [tabla 3](#). La PL, si bien en las condiciones adecuadas tiene riesgos mínimos, no es un procedimiento necesario para el diagnóstico y no ha resultado sencillo obtener consentimiento de los pacientes con ELA. En relación con los controles, la dificultad ha sido identificar pacientes sin criterios de exclusión.

A los 3-4 días luego de sembrado el pellet del LCR (días in vitro, DIV) pudimos observar células aisladas o en pequeños grupos en una de las muestras control (Control 1, Ctrl1) y en ambas muestras provenientes de pacientes con ELA (ELA1 y ELA2). Las células eran

adherentes, aplanadas y alargadas. En los siguientes días aumentó el número de células manteniéndose agrupadas, y a los 15 días las agrupaciones celulares presentaban su sector central confluyente. Su aspecto al microscopio de contraste de fases, así como su forma de crecimiento alcanzando confluencia en determinados sectores, comparado a las células gliales, fue similar al de los astrocitos (figura [12.A](#)). En la figura [12.B](#) se observa uno de los grupos o clusters de células con bajo aumento. Debido a que los volúmenes de LCR obtenido varió entre los pacientes, normalizamos el número de grupos celulares obtenidos por unidad de volumen (figura [12.B](#)).

Tabla 3. Datos de los pacientes y muestras de LCR

Pac.	Sexo, Edad	ALSFRS	LCR (ml)	# grupos, observaciones		Conducta		
				3 DIV	15 DIV	15 DIV	> 15 DIV	
Ctrl 1	F, 30	----	5	1, células aisladas	1, confluentes	fijación	detección marcadores	----
Ctrl 2	F, 69	----	10	s/crec.	----	----	----	----
ELA 1	M, 59	38/40	4	5, células	5, confluentes	fijación	detección marcadores	----
ELA 2	F, 49	21/40	1,5	1, células aisladas	1, confluentes	expansión	detección marcadores (P2-P5)	Criop. (P5, 5 viales)

Los cultivos de las muestras Ctrl1 y ELA1 fueron fijadas y procesadas para detectar marcadores celulares por inmunofluorescencia. Los cultivos de ELA2 se tripsinizaron y sembraron nuevamente en los pocillos de las placas de 4 (pasaje 1, P1) para evaluar su capacidad proliferativa. Se siguieron expandiendo hasta el pasaje 5 y se criopreservaron en FBS con 10% de DMSO, protocolo habitualmente utilizado para otros tipos celulares incluyendo las AbGCs. Entre los pasajes 2 y 5 algunas células se destinaron también a detectar marcadores.

Para evaluar un posible fenotipo glial de las células obtenidas del LCR realizamos inmunofluorescencia para marcadores que habitualmente identifican a estas células, y comenzamos con marcadores de astrocitos o AbGCs dado el aspecto que presentaron las células en la microscopía de contraste de fases. Otra posibilidad es que las células aisladas

del LCR pudiesen ser fibroblastos arrastrados en el trayecto de la aguja durante la PL. Por esta razón, utilizamos como control, y una línea de fibroblastos de pulmón humanos, y además cultivos de astrocitos de rata.

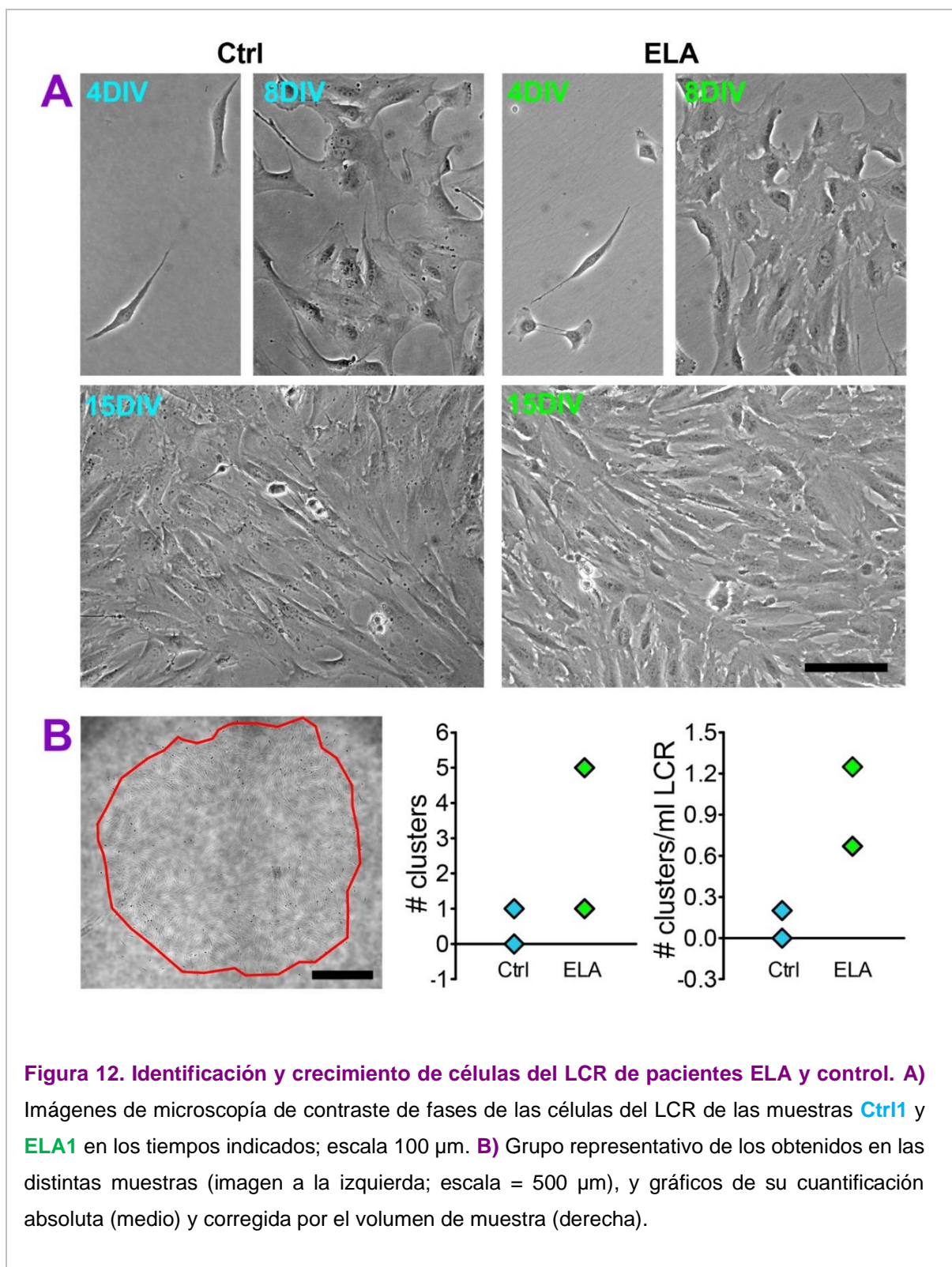
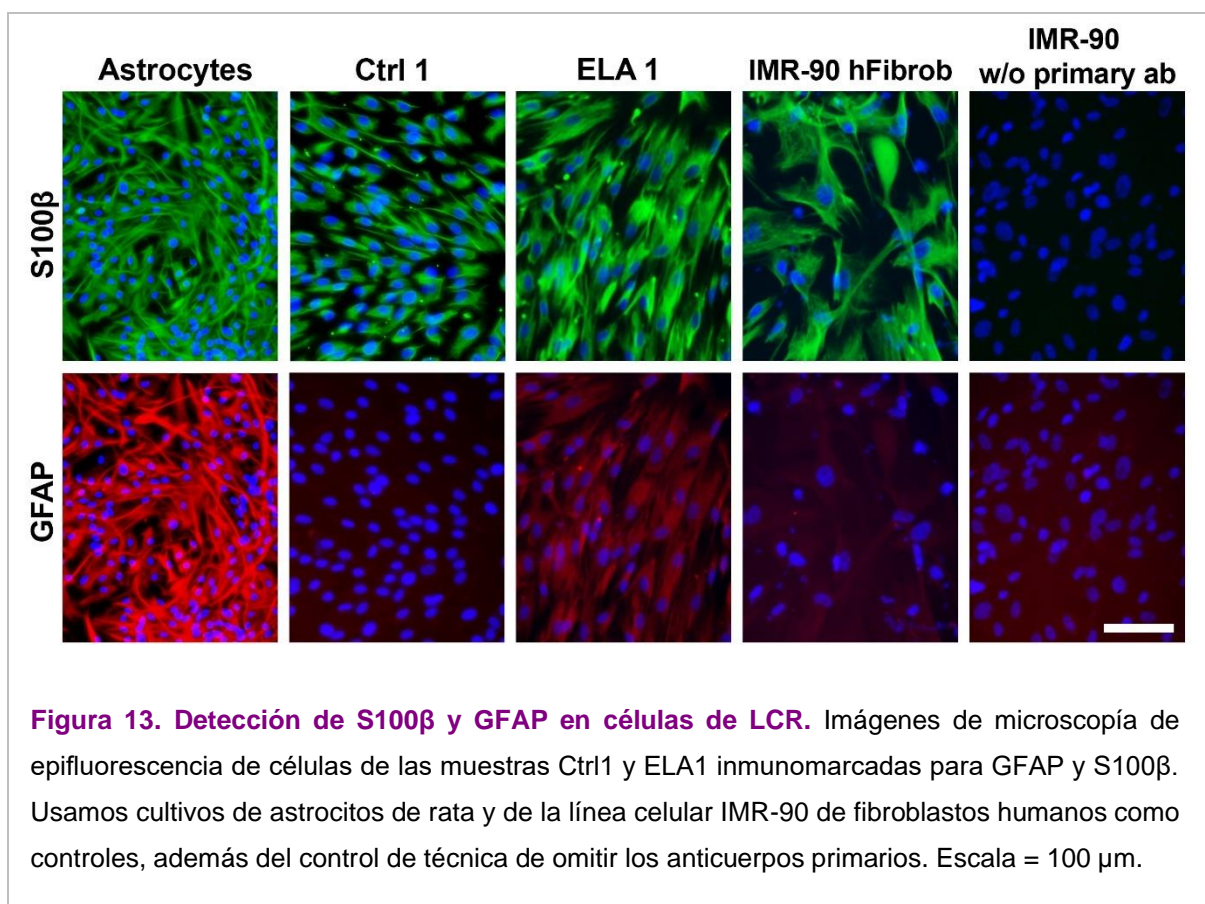


Figura 12. Identificación y crecimiento de células del LCR de pacientes ELA y control. A) Imágenes de microscopía de contraste de fases de las células del LCR de las muestras **Ctrl1** y **ELA1** en los tiempos indicados; escala 100 μ m. **B)** Grupo representativo de los obtenidos en las distintas muestras (imagen a la izquierda; escala = 500 μ m), y gráficos de su cuantificación absoluta (medio) y corregida por el volumen de muestra (derecha).

La figura 13 muestra la inmunorreactividad para S100 β y GFAP en las muestras Control1 y ELA1. Según el fabricante (ver tabla 1), los anticuerpos reconocen estos antígenos tanto en rata como en humanos. Tanto las células de la muestra control como las de ELA1 y ELA2 (figuras 13 y 14) expresan S100 β , al igual que los astrocitos de rata y los fibroblastos humanos. Sin embargo, la inmunorreactividad para GFAP es detectable solo en astrocitos y en bajos niveles en las muestras de los pacientes ELA (figuras 13 y 14). En la muestra



control 1 no se detecta GFAP, así como tampoco en los fibroblastos (figura 13).

En relación con el marcador de microglía Iba1, se observó una inmunorreactividad muy tenue, tanto en las células del LCR Control como las de los pacientes ELA (figura 14).

En las muestras de LCR del paciente ELA2, que fueron expandidas, la detección de marcadores se realizó a partir del pasaje 2. Las células resultaron inmunoreactivas con variaciones de intensidad, para otros marcadores de células gliales tales como: el marcador de filamentos intermedios del citoesqueleto vimentina, la Conexina 43 componente de los conexones, el transportador de glutamato GLT-1 y el proteoglicano condroitin sulfato NG2 (figura 15).

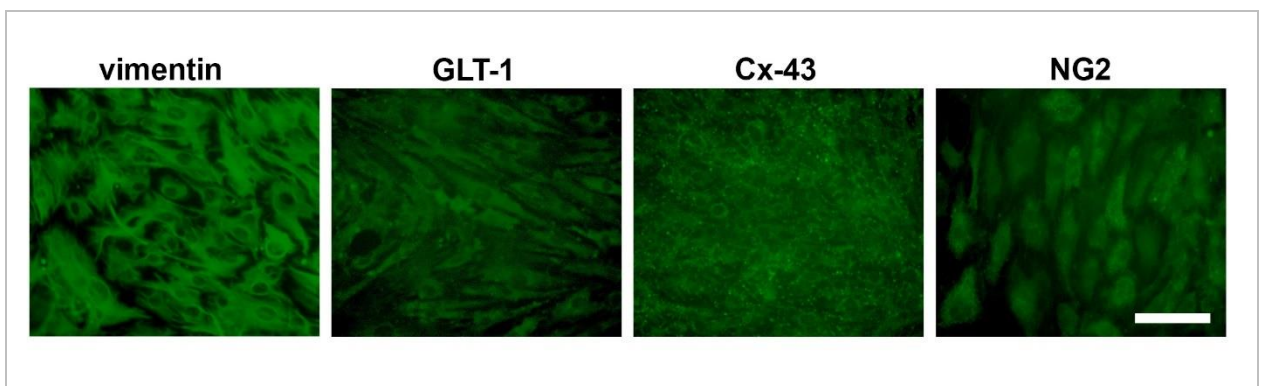
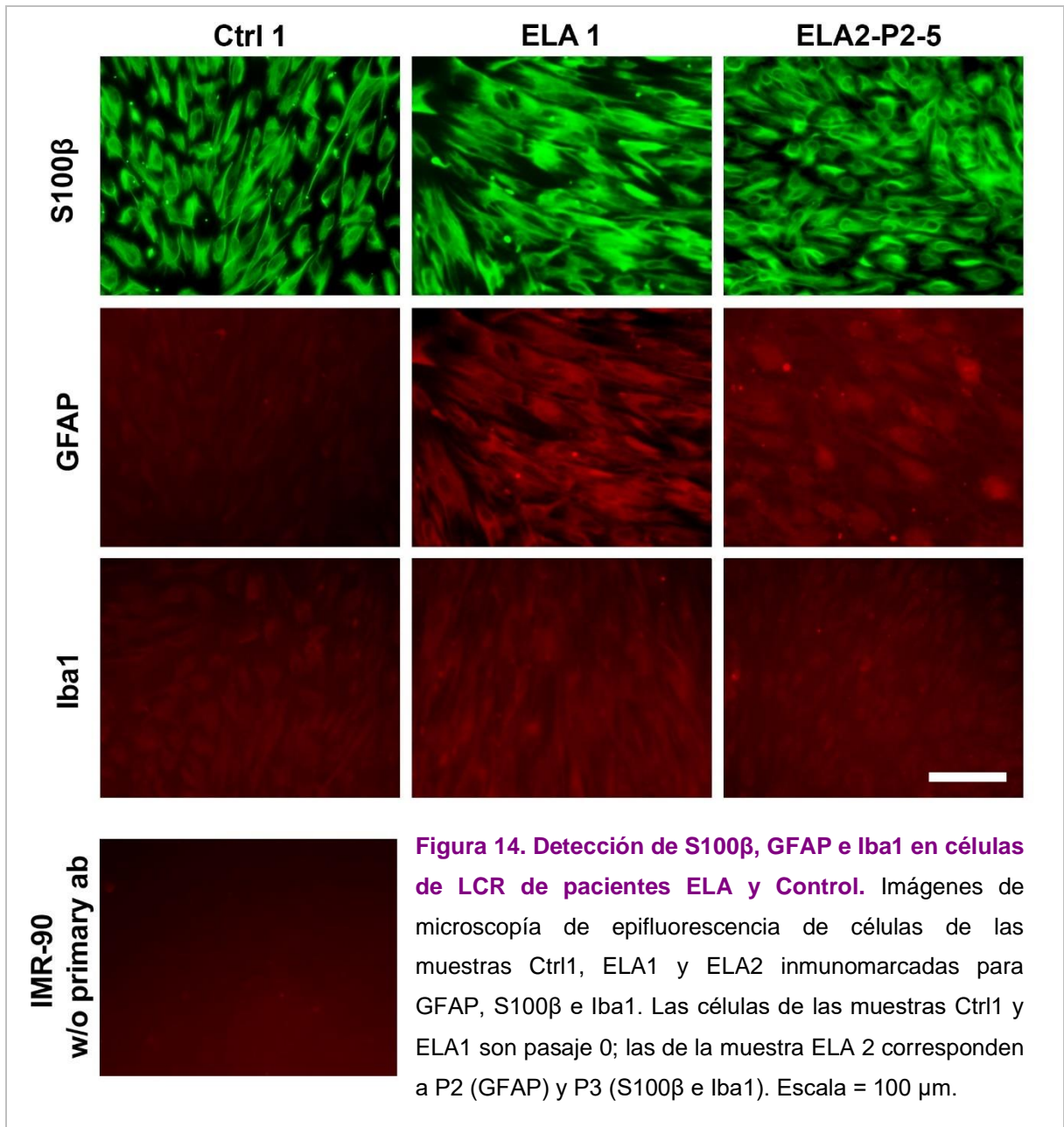


Figura 15. Detección de vimentina, GLT-1, Cx-43 y NG2 en células de LCR. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de células de la muestra ELA2 entre los pasajes 2 y 5 (P2-P5) inmunomarcadas para vimentina (P2), GLT-1 (P5), Cx-43 (P3), NG2 (P5).

Escala = 100 μ m.

Red mitocondrial en las células de pacientes con ELA

Para profundizar en la caracterización de las células del LCR obtenidas del LCR, utilizamos cultivos en pasaje 9 de las células del paciente ELA2 previamente criopreservadas. Dado que la cantidad de células disponibles es limitada, no fue posible evaluar la función mitocondrial por HRR, por lo que se evaluó la morfología mitocondrial. Para ello se sembraron las células en los LabTek adecuados para su visualización en el microscopio confocal invertido, y un grupo fue tratado con DCA. Luego de incubarlas con MitoTracker Deep Red, se examinaron por microscopía confocal. Observamos una disposición de las mitocondrias formando fundamentalmente redes amplias y filamentos largos y ramificados (figura [16.A](#)). Luego del procesamiento de las imágenes obtenidas, los resultados mostraron que las células del LCR presentan un promedio de 239 mitocondrias \pm 28.7 por célula, y que luego del tratamiento con DCA el número se incrementa a 444 \pm 52.9 (figura [16.C](#)).

La extensión o longitud total de la red mitocondrial (sumatoria de la longitud del esqueleto de todos los objetos identificados en cada célula), también fue mayor en las células tratadas con DCA comparadas con el vehículo en una proporción similar (6482 \pm 913.9 px versus 13490 \pm 198.2 px; figura [16.D](#)). En concordancia, no se observaron cambios en el promedio de longitud de las mitocondrias en cada célula luego del tratamiento con DCA (Ctrl 28.5 \pm 2.34, DCA 30.4 \pm 2.41; $p=0.6088$; $t_{22}=0.519$), ni tampoco en la relación inversa como indicador de fragmentación (número de mitocondrias/longitud; Ctrl 0.037 \pm 0.0029, DCA 0.035 \pm 0.0024; $p=0.6088$; $t_{22}=0.564$).

Con respecto a la distribución de las mitocondrias, las de tipo filamentosas son significativamente más abundantes que los otros grupos morfológicos (figura [16.E](#)), con un número 5.1 y 3.7 veces mayor que las puntiformes y reticulares respectivamente en el grupo control. En el grupo tratado también fueron más numerosas las mitocondrias filamentosas en 5.6 y 3.7 veces respecto a las puntiformes y reticulares. No hubo diferencias significativas entre el número de mitocondrias puntiformes y reticulares en el grupo control ($p=0.5148$) ni en el tratado con DCA ($p=0.1423$).

El tratamiento con DCA determinó un cambio en la distribución de las mitocondrias. El número de mitocondrias filamentosas fue significativamente mayor (casi 2 veces, 88%) que en el grupo control (figura [16.E](#)), sin modificar en número de las puntiformes ($p=0.3655$) ni de las reticulares ($p=0.2419$).

En relación con la longitud de las mitocondrias, ésta se distribuye mayoritariamente en las mitocondrias reticulares, representando un 82% y un 84% del total del esqueleto mitocondrial total en el grupo control y tratado con DCA respectivamente. Las diferencias de la extensión del sector reticular del esqueleto con respecto a las puntiformes y filamentosas son altamente significativas (figura [16.F](#)).

El tratamiento con DCA generó un aumento significativo en las dimensiones del esqueleto mitocondrial reticular, que fue más de 2 veces (114%) superior que en el grupo control (figura [16.F](#)). No se observaron efectos del tratamiento en la longitud que representan las mitocondrias filamentosas ($p=0.6469$) ni las puntiformes ($p=0.9836$).

El siguiente paso fue evaluar el efecto del tratamiento con DCA en la complejidad del esqueleto mitocondrial reticular. Para ello analizamos el número de ramificaciones y el número de puntos de unión entre las ramificaciones. El DCA provocó un mayor nivel de complejidad en las redes mitocondriales dado por un aumento de ambos

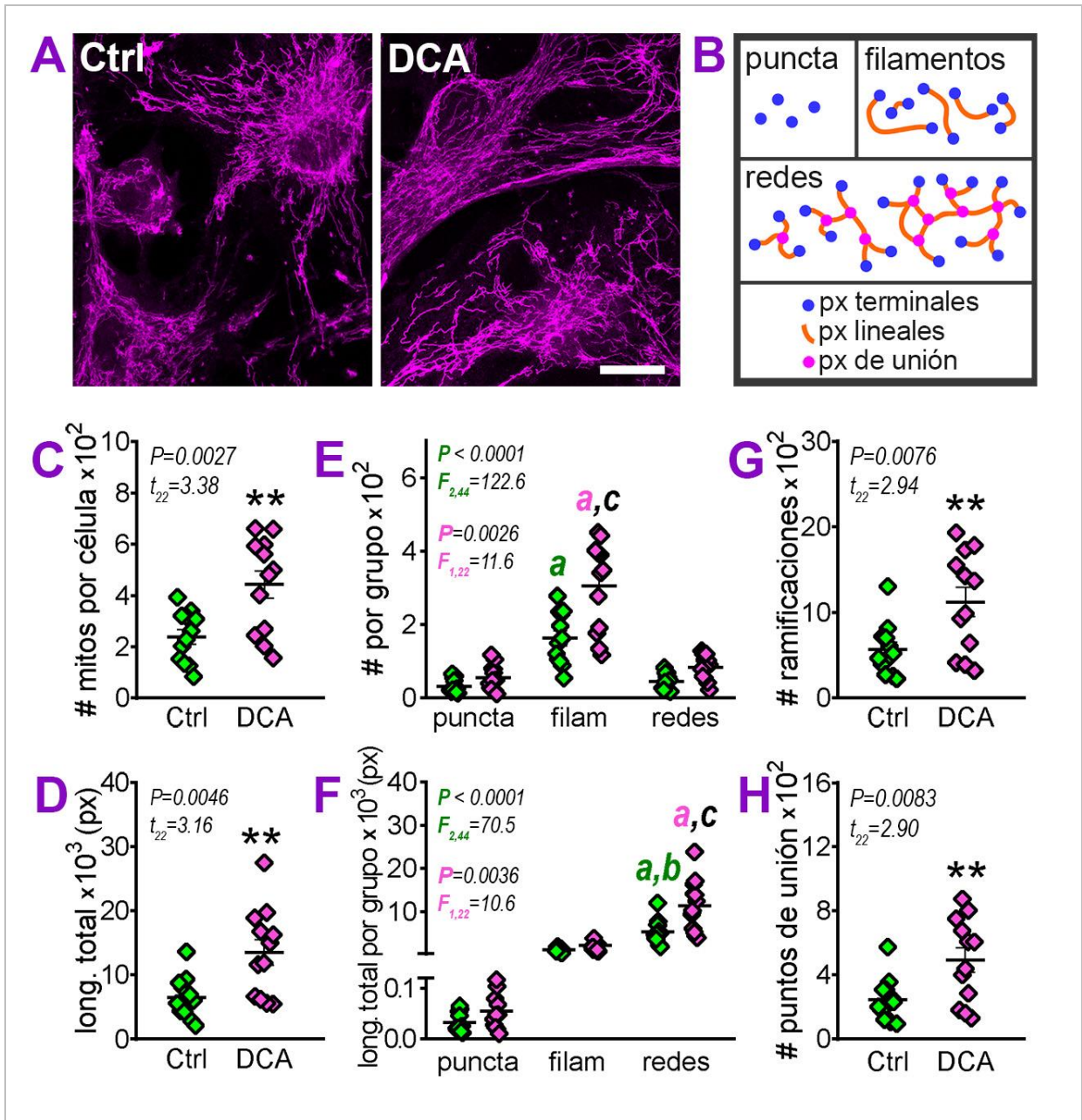


Figura 16. Evaluación de la morfología mitocondrial en células de LCR. **A)** Imágenes representativas de células marcadas con Mitotracker Deep Red. Escala= 20 μ m. **B)** Clasificación de mitocondrias para el análisis de distribución. **C)** Número (#) de mitocondrias por célula; **D)** Sumatoria de la longitud (long. total) de las mitocondrias en cada célula; **E,F)** Distribución del número (#) de mitocondrias y su longitud total en cada grupo morfológico (puncta, filamentosas o redes como se indica) en las células control (verde) y tratadas (magenta). *Comparación múltiple por Holm-Sidak* para la distribución (E): ^{a,a} $p < 0.001$ versus puncta y redes en grupo control y DCA respectivamente; ^c $p < 0.0001$ versus filamentos control. Para la longitud (F): ^a $p < 0.0001$ versus puncta y ^b $p < 0.001$ versus filamentos en el grupo control; ^a $p < 0.0001$ respecto a puncta y filamentos en grupo DCA; ^c $p < 0.0001$ versus redes control. **G,H)** Complejidad de las redes mitocondriales: cuantificación de la cantidad de ramificaciones y puntos de unión entre ellas. En **C,D,G,H):** ** $p < 0.01$ versus control.

parámetros evaluados (figura [16.G.H](#)).

Discusión

En este trabajo de tesis doctoral mostramos que la función mitocondrial de las células AbGCs, está asociada con la toxicidad para las MNs. Mostramos también que mediante la modulación metabólica de las AbGCs con DCA es posible mejorar la función mitocondrial y reducir su proliferación y neurotoxicidad. Además, la administración de DCA a las ratas SOD1G93A desde el inicio de los síntomas motores, provocó una disminución en la población de células identificadas como AbGCs en el asta anterior de la médula espinal, en la gliosis y en la neurodegeneración.

También aportamos datos preliminares que sugieren que es posible aislar células del LCR de pacientes con ELA y controles. Las células aisladas del LCR comparten algunos marcadores con las AbGCs, detectados por inmunofluorescencia. En una de las muestras de los pacientes mostramos que su morfología mitocondrial es modulable por DCA. Resta por aclarar si estos resultados se confirman con mayor número de muestras, si el hallazgo de las células se relaciona a la enfermedad y si el estudio de sus características aporta información que pueda utilizarse como insumo para evaluar la progresión clínica o ensayar tratamientos.

En conjunto, nuestros hallazgos brindan soporte para una terapéutica basada en la modulación de la función mitocondrial destinada a retrasar la progresión de la ELA, y abren la posibilidad de utilizar el LCR para obtener células para su estudio diagnóstico (nosológico o evolutivo) y el ensayo de terapias.

En trabajos previos mostramos que los astrocitos SOD1G93A neonatales presentaban una función respiratoria menor que los astrocitos salvajes (Miquel et al., 2012). En este trabajo analizamos la función mitocondrial de las AbGCs y observamos que el RCR es aún más reducido que en los astrocitos neonatales SOD1G93A, lo cual se correlaciona con su mayor toxicidad para las MNs (Díaz-Amarilla et al., 2011). Existen evidencias de que la morfología y la dinámica mitocondrial están asociadas a la actividad respiratoria, ya que las redes mitocondriales interconectadas están frecuentemente presentes en las células con una activa respiración mitocondrial, mientras que las células más quiescentes e inactivas metabólicamente, se caracterizan por presentar mitocondrias pequeñas y fragmentadas (Galloway et al., 2012; Mishra & Chan, 2016). En concordancia, encontramos una correlación positiva entre el RCR de los tres tipos celulares y la longitud promedio de las mitocondrias analizadas luego de su marcado con MitoTracker Green. Estudios previos con

microscopía electrónica de transmisión evidenciaron mitocondrias más cortas en las AbGCs en comparación con las observadas en los astrocitos neonatales salvajes (Jiménez-Riani et al., 2017). Nuestros resultados obtenidos con MitoTracker Green están en un rango de longitud mitocondrial similar a lo reportado en el estudio anterior para los astrocitos neonatales salvajes y AbGCs. Además, encontramos que los astrocitos obtenidos de neonatos SOD1G93A tenían mitocondrias de tamaño intermedio en comparación con los otros 2 grupos. Estos hallazgos sugieren que no solo la presencia de la SOD1G93A sino también el tiempo de exposición a la misma u otros factores estarían influyendo en la función y morfología mitocondrial. Al no contar con células tipo AbGCs provenientes de animales adultos como control, no podemos descartar que la diferente edad de los cultivos y de los animales de los que provienen, esté influyendo en las diferencias encontradas, dado que el envejecimiento en sí mismo produce disminución de la función mitocondrial (revisiones en (Desler et al., 2012; Grimm & Eckert, 2017; Reddy & Reddy, 2011)). La reducida función respiratoria y la menor longitud mitocondrial que describimos aquí, su alta tasa de proliferación y ausencia de inhibición por contacto y senescencia replicativa (Díaz-Amarilla et al., 2011) y algunas características ultraestructurales (Jiménez-Riani et al., 2017), revelan semejanzas entre las AbGCs y las células tumorales.

Habitualmente, las células tumorales exhiben una reducida fosforilación oxidativa y dependen de la glucólisis aeróbica para aumentar la disponibilidad de precursores de la biosíntesis de macromoléculas e impulsar el crecimiento y la proliferación (Zong, Rabinowitz, & White, 2016). En particular, el DCA se ha utilizado previamente para reducir el crecimiento celular de las células tumorales en un trabajo pionero del grupo de Michelakis (Bonnet et al., 2007), y en otros trabajos posteriores en cáncer pero también desde hace más tiempo en otras condiciones proliferativas y trastornos metabólicos (revisado en (James et al., 2017; Kankotia & Stacpoole, 2014)), principalmente debido a su capacidad para modificar el fenotipo glucolítico aeróbico. Ello se debe fundamentalmente a su efecto inhibitorio sobre la PDK, de manera que el complejo PDHC se mantiene activo favoreciendo el ingreso del piruvato al ciclo de Krebs (Stacpoole, 2017). En trabajos anteriores, demostramos que el DCA mejoró la actividad respiratoria mitocondrial y redujo la proliferación en cultivos de astrocitos de rata SOD1G93A (Miquel et al., 2012). Aquí mostramos que la modulación metabólica también disminuye el crecimiento y proliferación de las AbGCs. Sin embargo, no observamos efectos del DCA en la supervivencia de las AbGCs u otras modificaciones fenotípicas como cambios en la morfología celular, la expresión o distribución de marcadores previamente asociados a las AbGCs (Díaz-Amarilla et al., 2011). Las acciones del DCA sobre el crecimiento celular dependen de mecanismos moleculares variables asociados con el estado metabólico, el envejecimiento y/o las alteraciones en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (De Preter et al., 2016; Delaney et al., 2015; James &

Stacpoole, 2016; Stockwin et al., 2010). En nuestro modelo, si bien carecemos de controles de la misma edad, las AbGCs fueron capaces de mejorar el funcionamiento mitocondrial en respuesta al tratamiento con DCA. Aunque no hubo efectos significativos en la eficiencia de acoplamiento, dado que tanto la respiración basal como la acoplada a la producción de ATP mejoraron con el tratamiento, hubo un aumento de la capacidad de reserva respiratoria y el RCR.

Resulta interesante, que el DCA y otras estrategias que promueven la activación del PDHC, también mejoran la capacidad de reserva y reducen la proliferación y agresividad en líneas celulares de glioblastoma (Prabhu et al., 2015), lo que coincide con la capacidad del fármaco de reducir el crecimiento y proliferación en las AbGCs. Si el DCA está inactivando la actividad PDK, con el consecuente mantenimiento del PDHC en su forma desfosforilada activa, entonces, esperaríamos un mayor ingreso del piruvato a la mitocondria y una reducción de la producción de lactato. En concordancia, encontramos que la concentración de lactato en los medios de cultivo de las AbGCs expuestas al DCA fue menor que la de las células expuestas solo al vehículo. Aunque el lactato derivado de los astrocitos se ha considerado importante para mantener el metabolismo energético en las neuronas (Barros et al., 2018; Bolaños, 2016), la importancia cuantitativa y funcional es controvertida (Dienel, 2017), destacando la importancia de las concentraciones comparativas y subcelulares de diferentes metabolitos, expresión de enzimas vinculadas al metabolismo y el estado fisiológico. Por ejemplo, en condiciones fisiológicas los astrocitos tienen un perfil bioenergético oxidativo (Lovatt et al., 2007), pero son capaces de mantener un metabolismo glicolítico si se inhibe la función mitocondrial (Almeida, Almeida, Bolaños, & Moncada, 2001; Bolaños, Almeida, & Moncada, 2010). En concordancia, la expresión de las distintas isoformas de PDK (1-4) varía entre diferentes tipos celulares, incluyendo astrocitos y neuronas, que expresan las isoformas 1, 2 y 4, pero con predominancia de la 1 en neuronas y la 2 y 4 en astrocitos. Es también distinto el nivel de fosforilación del PDHC, que es mayor en astrocitos, coincidiendo con un fenotipo más glicolítico y la compartimentación de los procesos bioenergéticos en el SNC (Halim et al., 2010). En nuestro modelo, la disminución del lactato ocasionada por el tratamiento con DCA, no tendría consecuencias negativas sobre la supervivencia de las motoneuronas, sino que por el contrario, el tratamiento de las AbGCs con DCA redujo su neurotoxicidad, en forma similar a lo que mostramos previamente para los astrocitos neonatales de rata SOD1G93A (Miquel et al., 2012). De hecho, la toxicidad del medio condicionado de las AbGCs es elevada en diluciones de 1:100 como confirmamos en este estudio, pero también incluso en diluciones de 1:1000 (Díaz-Amarilla et al., 2011), condiciones en que la concentración de lactato sería demasiado baja para tener efectos relevantes. Otros datos que confirman que la actividad tóxica mediada por la expresión de la SOD1G93A no sería debida a una disminución del lactato, proviene de

estudios con astrocitos SOD1G93A de ratón que también han mostrado actividad tóxica para las MN en cultivo (Nagai et al., 2007), los cuales tienen mayor producción de lactato en comparación con los astrocitos nTg (Valbuena, Tortarolo, Bendotti, Cantoni, & Keun, 2017).

La altísima toxicidad de las AbGCs en cocultivos, y fundamentalmente su persistencia en los medios condicionados muy diluídos y en presencia de factor trófico favorecen la idea de que la muerte de las MNs en estos modelos tiene una causa más compatible con la presencia de factores tóxicos, que con la interferencia con vías tróficas. Una elevada concentración de lactato y un perfil metabólico glicolítico ha sido también relacionado con la activación del fenotipo proinflamatorio luego del estímulo con LPS en células de la línea microglial murina BV-2 (Gimeno-Bayón et al., 2014; Voloboueva et al., 2013). Además, la producción de factores proinflamatorios inducida por LPS se relaciona con una extensa fisión y localización mitocondrial de Drp1, y puede atenuarse inhibiendo la fisión mitocondrial (Park et al., 2013). En concordancia, en un estudio reciente, el estímulo con LPS en cultivos primarios de microglía provocó una reprogramación metabólica hacia la glicólisis asociada a fisión mitocondrial. Esto coherente con el efecto de la inhibición de la fisión mitocondrial que produjo un aumento de la respiración basal y en la respiración acoplada a la síntesis de ATP, además de modular la expresión de genes proinflamatorios en microglía aislada de un modelo de neurodegeneración in vivo (Nair et al., 2019).

La proliferación se asocia también con perfiles glicolíticos aeróbicos, y el DCA redujo la proliferación de las AbGCs en cultivos subconfluentes, y como demostramos previamente, también en cultivos de astrocitos neonatales (Miquel et al., 2012). Sin embargo, la reducción de la neurotoxicidad no fue debida a una disminución en el número de células tóxicas sino a un cambio fenotípico, ya que la exposición a DCA no modificó el número de AbGCs en cultivos confluentes que fueron los utilizados para evaluar la supervivencia de MN o para la obtención de medios condicionados. Por otro lado, la exposición directa de MNs purificadas a DCA, no modificó la supervivencia, al menos a la concentración 5 mM que utilizamos en nuestro trabajo. Estos resultados no son inesperados, ya que datos previos mostraron que el PDHC neuronal opera cerca de la actividad máxima con bajos niveles de PDH fosforilada (Halim et al., 2010). Por lo tanto, el DCA actuaría principalmente en las células gliales, en particular aquellas que muestran un fenotipo inflamatorio en el que el perfil metabólico es más glicolítico, y con bajos niveles de PDHC activo.

Un dato importante es que el tratamiento con DCA no provocó cambios en la concentración de glucosa en el medio de cultivo, por lo que el aumento de la función mitocondrial observado no depende de una mayor captación del metabolito sino de un cambio en su utilización como lo muestra la disminución del lactato. Para profundizar en la comprensión de los mecanismos involucrados en los efectos observados se requeriría hacer un estudio del perfil de expresión de enzimas relacionadas al metabolismo, así como su actividad, y

evaluar si el DCA provoca algún cambio. La exposición a DCA no cambió la expresión del Glt1, indetectable por inmunofluorescencia en nuestro trabajo (ni por western blot (Díaz-Amarilla et al., 2011)), aunque no podemos descartar que existan otros mecanismos que favorezcan el ingreso de glutamato para su utilización metabólica. Tampoco observamos cambios aparentes en la inmunofluorescencia para glutamina sintasa, que también podría influir en la disponibilidad del mismo glutamato. Otra posibilidad, es que las AbGCs metabolicen otros sustratos como los lípidos al igual que los astrocitos (Eraso-Pichot et al., 2018). Los datos de microscopía electrónica indican que estas células no muestran reservas de glucógeno, pero presentan una cantidad importante de gotas lipídicas (Jiménez-Riani et al., 2017), en forma similar a lo que ocurre en diversos tumores sólidos malignos, incluyendo el glioblastoma (Geng & Guo, 2017). Estos organelos lipídicos se han encontrado asociados a mitocondrias con las cuales comparten sitios de contacto para el intercambio de ácidos grasos y otros lípidos, en forma dependiente del estado de fusión (Benador, Veliova, Liesa, & Shirihai, 2019; Rambold, Cohen, & Lippincott-Schwartz, 2015; Rambold & Pearce, 2018), por lo que sería interesante evaluar si el DCA genera cambios en la distribución y relacionamiento de las mitocondrias con las gotas lipídicas y otros organelos citoplasmáticos.

Estos resultados soportan la hipótesis de que las AbGCs podrían experimentar un cambio metabólico similar a las células tumorales y que su modulación con DCA limita su capacidad proliferativa y neurotóxica.

El cambio hacia un metabolismo glicolítico aeróbico en conjunto con una dinámica mitocondrial que favorece el estado de fisión mitocondrial (Kashatus, 2018), facilitan la división y la migración celular, además de las metástasis (Sun et al., 2018). Tal fenotipo también es característico de los estados proinflamatorios de las células inmunes y la glía (Jha, Lee, & Suk, 2016; P. S. Liu & Ho, 2018; Orihuela, McPherson, & Harry, 2016; Rambold & Pearce, 2018; Van den Bossche & Saraber, 2018). En este escenario, la modulación del fenotipo metabólico aparece como una estrategia atractiva para aplicar en la ELA, en la que la gliosis y la neuroinflamación se han asociado a la progresión de la enfermedad (Hooten et al., 2015; Trías, Ibarburu, Barreto-Núñez, & Barbeito, 2016).

En la médula espinal de las ratas SOD1G93A se detectan células hipertróficas tipo AbGCs, doble marcadas para GFAP y S100 β al comienzo de los síntomas motores, y su número aumenta con la progresión de la parálisis y la degeneración de las MNs (Díaz-Amarilla et al., 2011), lo que sugiere un vínculo entre su aparición y la propagación de la enfermedad. En el presente trabajo, el tratamiento de las ratas SOD1G93A con DCA desde el inicio del déficit motor, redujo la población de células identificadas como AbGCs en la médula espinal

lumbar. Ello ocurrió en un período en el que estudios previos detectaron una disminución de la función en las mitocondrias aisladas de la médula espinal de las ratas SOD1G93A con respecto a las ratas nTg de la misma edad (P. Cassina et al., 2008).

Proponemos que el cambio metabólico y la neurotoxicidad detectado en las AbGCs en cultivo podría ocurrir también *in vivo* y afectar la supervivencia neuronal en el área circundante.

¿Por qué correlacionar un determinado fenotipo metabólico glial con la neurotoxicidad? Los astrocitos, son capaces de mejorar su utilización de la glucosa al aumentar la ruta de las pentosas fosfato y la actividad del ciclo de Krebs en condiciones inflamatorias, relacionadas a un fenotipo neurotóxico (Gavillet, Allaman, & Magistretti, 2008). Además, el metabolismo glicolítico aeróbico es característico del fenotipo microglial proinflamatorio (Amici, Dong, & Guerau-de-Arellano, 2017; Orihuela et al., 2016), que se ha asociado con una neuroinflamación neurotóxica en la ELA (Hooten et al., 2015). En este sentido, teniendo en cuenta que las AbGCs comparten características de ambos tipos celulares, una reprogramación metabólica inducida por DCA podría explicar la reducción de sus propiedades neurotóxicas *in vitro*. De hecho, la administración de DCA a ratas SOD1G93A sintomáticas, además de disminuir el número de células identificadas como AbGCs, redujo la microgliosis y la astrogliosis, y previno parcialmente la pérdida y atrofia de las MNs. Estos resultados están de acuerdo con nuestro trabajo previo en ratones SOD1G93A tratados con DCA, en el cual, el estudio de la médula espinal mostró por un lado una recuperación de la función mitocondrial medida por HRR, y una reducción de la astrogliosis y la pérdida neuronal, además de un retraso en la muerte y disminución de la fuerza de prensión (Miquel et al., 2012).

La reducción del número de AbGCs en la médula en el modelo animal, podría explicarse por una disminución en la proliferación como observamos en los experimentos en cultivo, o por una mayor tasa de muerte inducida por el fármaco, ya sea directamente o en forma secundaria a efectos en células gliales circundantes o a nivel sistémico.

En relación al mecanismo por el que el DCA produce sus efectos, además de sus acciones sobre el metabolismo de la glucosa ya discutidos, también puede existir un efecto sobre el metabolismo lipídico, ya sea en las mismas células de la médula espinal, o a nivel del músculo como se demostró previamente en el modelo de ratón ALS SOD1G86R (Palamiuc et al., 2015). Tampoco podemos excluir otras acciones del fármaco, mediadas por sus efectos sobre el metabolismo sistémico (James et al., 2017), dado que la neuroinflamación se acompaña de un estado inflamatorio (Beers & Appel, 2019) y alteraciones metabólicas (Kirk, Tracey, Steyn, & Ngo, 2019) a nivel general.

Aunque se necesitan estudios mecanísticos más extensos, nuestros resultados proporcionan evidencia indirecta que respaldan al complejo PDK/PDHC como un objetivo

terapéutico relevante para intervenir en la progresión de la enfermedad en la ELA. Sería de gran interés explorar estos mecanismos en otros modelos de la enfermedad, ya que aunque muchas de las proteínas relacionadas con la ELA familiar y esporádica, incluidas otras mutaciones en la SOD1, TDP-43, FUS y péptidos de los repetidos GGGGCC del C9orf72, se han asociado con daño mitocondrial (Smith et al., 2017), la mitocondriopatía exacta no se ha caracterizado por completo. Además, la evidencia de asociación disfunción mitocondrial con el fenotipo neurotóxico de la glía se ha demostrado solo en los modelos murinos SOD1G93A, para los astrocitos (P. Cassina et al., 2008; Miquel et al., 2012), y en el presente trabajo para las AbGCs.

En relación a su posible utilización en los pacientes con ELA, el DCA tiene la ventaja de haber sido utilizado previamente en ensayos clínicos en humanos para tratar de forma segura enfermedades mitocondriales (Abdelmalak et al., 2013; Stacpoole, Gilbert, et al., 2008; Stacpoole, Kurtz, Han, & Langae, 2008) y tumores cerebrales de tipo glioblastoma (Michelakis et al., 2010). Investigaciones en el área del cáncer sugieren que el DCA puede tener otras propiedades beneficiosas, como aumentar la efectividad y disminuir los efectos secundarios de otros tratamientos radio- o quimioterápicos cuando se usa asociado a ellos, y en efecto, se han propuesto varios derivados de DCA que incluyen terapias combinadas (James et al., 2017). Además, dada la diversidad de mecanismos patogénicos subyacentes en la enfermedad, el combinar tratamientos que apunten a mecanismos patogénicos independientes también podrían ser beneficiosos en la ELA, como proponen por ejemplo en el estudio de Frakes et al (Frakes, Braun, Ferraiuolo, Guttridge, & Kaspar, 2017).

Un aspecto importante a tener en cuenta en cualquier tratamiento son los efectos secundarios negativos. En este sentido, se ha reportado que la administración crónica de DCA puede causar neuropatía periférica, pero ello no impidió su uso en el tratamiento de pacientes con glioblastoma y fue reversible con la reducción de la dosis (Michelakis et al., 2010; Stacpoole, Gilbert, et al., 2008). De todas maneras, la inducción de neuropatía periférica en la rata requirió una mayor dosis diaria (500 mg/kg) (Calcutt et al., 2010) que la utilizada en nuestro estudio (100 mg/kg). Una dificultad para seleccionar una dosis adecuada de DCA sin llegar a tener efectos secundarios puede depender de la capacidad del fármaco de inhibir su propio metabolismo luego de la administración repetida (James, Cornett, Yan, Henderson, & Stacpoole, 1997). Su metabolización hepática a glioxilato (que es inactivo sobre la PDK) es catalizada por la glutatión transferasa zeta1 (GSTZ1), en cuyo gen se han detectado polimorfismos que llevan a la existencia de varios haplotipos de GSTZ1 con diferente actividad, responsables de las diferencias en la farmacocinética y farmacodinamia del DCA en humanos (James & Stacpoole, 2016). Sin embargo, recientemente se ha reportado la posibilidad de genotipar GSTZ1 y así lograr una dosis personalizada de DCA (Langae et al., 2018).

Con la finalidad de trasladar nuestros resultados a los pacientes en el futuro, en una segunda parte del trabajo nos preguntamos si en individuos portadores de ELA pueden identificarse fenotipos gliales similares a las células AbGCs. Se ha reportado la presencia de células gliales hipertróficas positivas para S100 β en estrecho contacto con motoneuronas en degeneración en estudios neuropatológicos de la médula espinal de los pacientes (Migheli et al., 1999). Más recientemente se han identificado células hipertróficas, proliferantes aparentemente de estirpe microglial que expresan el marcador de células madre hematopoyéticas y progenitores CD34, en el asta ventral de la médula espinal de pacientes con ELA (M. Kovacs et al., 2019).

Dada la similitud de las AbGCs con células tumorales, y que éstas pueden llegar al LCR por varias vías (Mammoser & Groves, 2010), nos propusimos generar un proyecto traslacional donde evaluar la presencia de estas células en el LCR de pacientes que concurren al CELAU (Centro de ELA del Uruguay, del cual formamos parte) en el Hospital de Clínicas. Al momento de la finalización de esta tesis hemos reunido un grupo de datos que, aunque se requeriría aumentar el n de los grupos, muestran que es posible aislar células somáticas del LCR. Los resultados sugieren además, que en los individuos portadores de ELA, estas células tienen mayor capacidad de proliferación que en los individuos control.

Las células obtenidas pudieron ser cultivadas y proliferaron, generando parches de monocapas. Su morfología es similar a la de los astrocitos y AbGCs. En su caracterización evaluamos la expresión de algunos marcadores mediante inmunofluorescencia, y algunos de ellos son compatibles con una estirpe glial. Son positivas para S100 β , al igual que los astrocitos y las AbGCs (Díaz-Amarilla et al., 2011), aunque este marcador también lo encontramos en la línea IMR-90 de fibroblastos humanos. Expresan también la proteína de filamentos intermedios vimentina, la conexina-43, niveles bajos del transportador de glutamato Glt1 y NG2, y no parecen expresar el marcador de microglía Iba1. Es de destacar que estas células obtenidas del LCR expresan GFAP. La inmunoreactividad es baja, por lo que requeriría confirmarse por métodos más sensibles como western blot o en su defecto PCR. Esto es importante porque su presencia, de confirmarse sugiere su estirpe glial. La distribución de GFAP no es fibrilar, en forma similar a lo que ocurre en las AbGCs, e interesantemente, se encontró en las muestras de los dos pacientes, pero no en el control. Al igual que todos los demás datos, esto también debería confirmarse por western blot y PCR, y por supuesto en mayor número de muestras. Estos datos resultan interesantes, y no encontramos antecedentes en la bibliografía de la obtención de células de este tipo a partir del LCR. Si bien queda mucho para caracterizar, quisimos evaluar si su fenotipo podía modificarse mediante modulación metabólica en las células de uno de los afectados por ELA. Dada la baja disponibilidad de muestra, no fue posible estudiar la función mitocondrial

mediante HRR, por lo que realizamos marcado con una sonda mitocondrial fluorescente y analizamos su morfología. Las células presentaban una red mitocondrial amplia y predominantemente organizada en redes, más que en mitocondrias aisladas o fragmentadas. Esto es una diferencia importante con lo observado en las AbGCs obtenidas de las ratas SOD1G93A. Las características morfológicas son más parecidas a la de los astrocitos salvajes, y como mencionamos antes, no fue posible analizar la función. Probablemente estas células sean distintas a las obtenidas de las ratas, de hecho, no tenemos datos de genotipado de los pacientes, y la mayor probabilidad es que no sea portador de la SOD1G93A o cualquier otra mutación conocida por no ser una ELA familiar. Un aspecto a tener en cuenta es que a diferencia de las AbGCs podrían presentar senescencia replicativa. Ello podría explicar la morfología mitocondrial observada, si la comparamos con el estudio en que colaboramos recientemente sobre la senescencia en células tumorales (Martínez et al., 2019). A pesar de estas limitaciones, pudimos evaluar que son capaces de responder al DCA. Para ello utilizamos un plugin del ImageJ (Valente et al., 2017) que no habíamos utilizado previamente y que nos permitió evaluar la totalidad de la red mitocondrial. En respuesta al tratamiento con DCA, observamos un aumento del número de mitocondrias, pero acompañado por un aumento de la longitud total, con lo cual no sería dado por una fragmentación, sino que podría corresponder a un aumento de la dinámica mitocondrial. Este efecto sería similar al que se encuentra en un trabajo reciente, donde se muestra que el DCA logra restablecer la dinámica de fusión mitocondrial luego de su inhibición (O'Hara, Davis, Adlesic, Hayes, & Davey, 2019). En concordancia, en nuestro trabajo la complejidad de la red mitocondrial es mayor luego del tratamiento con DCA. Además, la sumatoria de la longitud de las mitocondrias de la red sería representativa de la masa mitocondrial (Valente et al., 2017), por lo que su aumento podría sugerir un efecto del fármaco en estimular la biogénesis, aunque esto debe ser confirmado. Retomando la importancia de la correlación entre la morfología y función, un aumento de la masa mitocondrial podría explicar al menos en parte, el aumento de la RMax que lleva también a una mayor reserva respiratoria que encontramos luego del tratamiento de las AbGCs. Si bien los datos morfológicos permiten sugerir que el DCA podría aumentar la función mitocondrial en las células del LCR, para confirmar esta presunción se requieren estudios funcionales. Al no tener gran disponibilidad de muestra, podríamos evaluar la función mediante el analizador de flujo extracelular Seahorse, o aproximarnos mediante análisis del potencial de membrana mitocondrial por microscopía o fluorimetría utilizando sondas específicas combinadas.

De la misma manera resta por establecer la actividad tóxica que estas células puedan ejercer sobre las MNs. Para ello deberíamos realizar co-cultivos de las células del LCR con MNs o preparar medios condicionados para tratarlas.

En resumen, mediante estudios *in vitro* logramos resultados que muestran una función mitocondrial reducida en las AbGCs altamente proliferativas y neurotóxicas, fenotipo que puede ser modificado modulando la actividad mitocondrial con DCA. En estudios *in vivo*, el DCA redujo la cantidad de AbGCs, la gliosis y la neurodegeneración en la médula espinal. En otro cuerpo de resultados mostramos que es posible aislar y cultivar células del LCR de pacientes y controles obtenido por punción lumbar, y que la morfología mitocondrial de las mismas es modulable por DCA.

Nuestra hipótesis e interpretación de lo que puede estar ocurriendo en la ELA a partir de los antecedentes y resultados obtenidos se resumen en la [figura 17](#).

En conclusión, aquí mostramos que la modulación metabólica con DCA es efectiva para disminuir la toxicidad de las AbGC para MNs en cultivo y para reducir la pérdida de MNs y la gliosis en la médula espinal degenerativa de ratas SOD1G93A cuando se administra después del inicio de las alteraciones motoras. Junto con nuestros resultados anteriores sobre los efectos beneficiosos del DCA en el desempeño motor y la supervivencia de los ratones con SOD1G93A, estos hallazgos destacan la posibilidad de que el DCA pueda tener beneficios terapéuticos en pacientes con ELA. Otro hallazgo relevante es la obtención de células del LCR de los pacientes, que genera la posibilidad de su estudio para el conocimiento de mecanismos de la enfermedad, para la evaluación del genotipo y fenotipo como biomarcadores, y el ensayo de tratamientos.

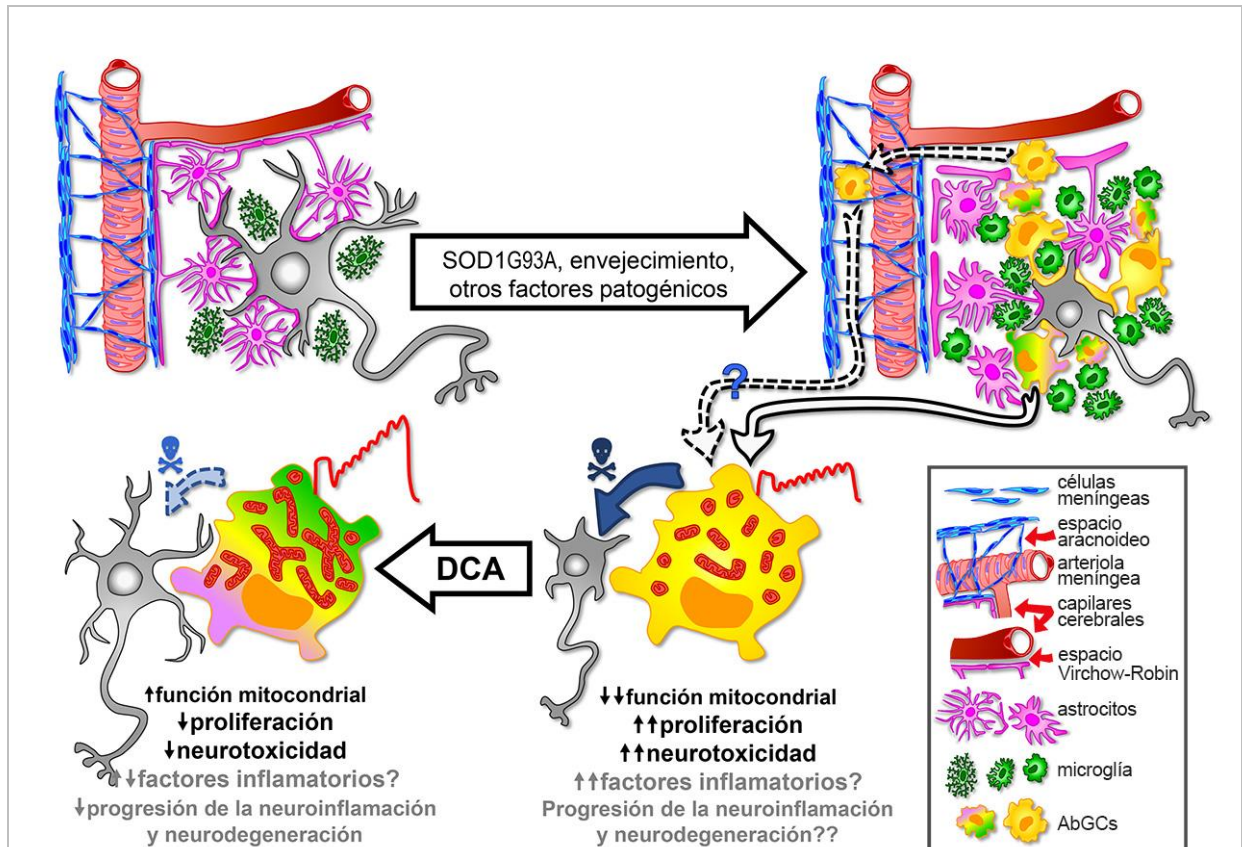


Figura 17. Resumen de la interpretación de los datos obtenidos en esta tesis. Distintos mecanismos patogénicos operando en diferentes etapas generan cambios neurodegenerativos y neuroinflamatorios, que según los antecedentes y nuestra hipótesis se asocian a alteración en la función mitocondrial no solo de las neuronas sino también de la glía. Los esquemas de la parte superior muestran un fragmento del microambiente tisular en la médula espinal normal (izquierda) y en la ELA (derecha) con las modificaciones que se plantean en los tipos celulares representados como se indica en el recuadro. La flecha punteada en la parte superior propone la hipótesis de el LCR como fuentes de AbGCs en humanos. La flecha continua destaca y amplía la representación de las AbGCs en los esquemas de la parte inferior.

Los esquemas de la parte inferior representan las principales características estudiadas de las AbGCs en cultivo (derecha) comparadas a la respuesta al DCA (izquierda): toxicidad hacia motoneuronas representado con las flechas azules, morfología mitocondrial y respirometría.

El fenotipo reactivo de la glía proinflamatoria se caracteriza por cambios morfológicos y moleculares, elevada proliferación, neurotoxicidad y un metabolismo más glicolítico que oxidativo. El ambiente neuroinflamatorio generaría la aparición de fenotipos gliales aberrantes con un fenotipo reactivo exacerbado, sin senescencia replicativa y otras características que las asemejan a células tumorales. Estas células aberrantes podrían encontrarse en el LCR, y de esta manera ser aisladas del mismo para su estudio.

El tratamiento con DCA, al mejorar la función mitocondrial en la glía, mejoraría otros aspectos del fenotipo inflamatorio y neurotóxico, reduciendo la neurodegeneración y probablemente la progresión de la enfermedad.

Perspectivas

Como perspectivas planteamos:

- 1) De acuerdo a los resultados alcanzados en cada uno de los objetivos específicos proponemos: Profundizar en el análisis de las imágenes obtenidas de la red mitocondrial por microscopía confocal en células vivas en cultivo, perfeccionando la utilización del plugin que usamos para el análisis y realizar registros a lo largo del tiempo de las modificaciones de la red mitocondrial eventualmente en comarcado con otros componentes citosólicos. Por otra parte, y como complemento a la respirometría, evaluar la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, y modificaciones oxidativas que pudiesen explicar la toxicidad de las AbGCs.
- 2) Evaluar el efecto del DCA sobre marcadores de proliferación o apoptosis en comarcado con identificadores de estirpe celular en animales in vivo para caracterizar mejor el mecanismo que lleva a la disminución del número de AbGCs en la médula espinal de las ratas SOD1G93A.
- 3) Incrementar el número de individuos para el estudio del LCR a los efectos de lograr la validación estadística de nuestras observaciones. Intentar la clasificación genética de los pacientes de acuerdo al estudio de la presencia en el DNA de al menos 4 de las mutaciones más frecuentes: C9orf, SOD1, TARDP y FUS. Estamos realizando gestiones para alcanzarlo en el marco del CELAU.

Otras actividades durante el desarrollo de esta Tesis

- ◆ Participación en la generación y funcionamiento del CELAU, como Centro Interdisciplinario destinado a la asistencia, enseñanza, investigación y difusión del conocimiento sobre de la ELA.
- ◆ Colaboración en proyectos de los que destacamos:
 - “Análisis de la red mitocondrial en los monocitos sanguíneos de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica y controles” (proyecto de tesis de maestría de Erik Winiarski).
 - “Análisis Lipidómico en Pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica: búsqueda de nuevos Biomarcadores del inicio y seguimiento de la enfermedad” (I+D, CSIC, responsable Andrés Trostchansky).
 - “Rol de la función mitocondrial en modelos de dolor crónico y su modulación metabólica por dicloroacetato” (Tesis de doctorado de Valentina Lagos-Rodríguez)

Trabajo publicado de la tesis

- ◆ **Martínez-Palma L**, Miquel E, Lagos-Rodríguez V, Barbeito L, Cassina A, Cassina P. Mitochondrial Modulation by Dichloroacetate Reduces Toxicity of Aberrant Glial Cells and Gliosis in the SOD1G93A Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2019 Jan;16(1):203-215. doi: 10.1007/s13311-018-0659-7.

Trabajos en los que contribuí durante el desarrollo de la tesis

- ◆ Trias E, Ibarburu S, Barreto-Núñez R, Babdor J, Maciel TT, Guillo M, Gros L, Dubreuil P, Díaz-Amarilla P, Cassina P, **Martínez-Palma L**, Moura IC, Beckman JS, Hermine O, Barbeito L. Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2016 Jul 11;13(1):177. doi: 10.1186/s12974-016-0620-9.
- ◆ Trostchansky A, Mastrogiovanni M, Miquel E, Rodríguez-Bottero S, **Martínez-Palma L**, Cassina P, Rubbo H. Profile of Arachidonic Acid-Derived Inflammatory Markers and Its Modulation by Nitro-Oleic Acid in an Inherited Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Front Mol Neurosci. 2018 Apr 30;11:131. doi: 10.3389/fnmol.2018.00131. eCollection 2018.

- ◆ Marton S, González B, Rodríguez-Bottero S, Miquel E, **Martínez-Palma L**, Pazos M, Prieto JP, Rodríguez P, Sames D, Seoane G, Scorza C, Cassina P, Carrera I. Ibogaine Administration Modifies GDNF and BDNF Expression in Brain Regions Involved in Mesocorticolimbic and Nigral Dopaminergic Circuits. *Front Pharmacol.* 2019 Mar 5;10:193. doi: 10.3389/fphar.2019.00193. eCollection 2019.
- ◆ Martínez J, Tarallo D, **Martínez-Palma L**, Victoria S, Bresque M, Rodríguez-Bottero S, Marmisolle I, Escande C, Cassina P, Casanova G, Bollati-Fogolín M, Agorio C, Moreno M, Quijano C. Mitofusins modulate the increase in mitochondrial length, bioenergetics and secretory phenotype in therapy-induced senescent melanoma cells. *Biochem J.* 2019 Sep 10;476(17):2463-2486. doi: 10.1042/BCJ20190405.
- ◆ Lagos-Rodríguez V, **Martínez-Palma L**, Cassina A, Lago N, Cassina P. Reduced mitochondrial bioenergetic parameters in the spinal cord of rodents associated to chronic pain: Improvement by the metabolic modulator dichloroacetate. *En evaluación en la revista Pain.*



Referencias bibliográficas

- Abdelmalak, M., Lew, A., Ramezani, R., Shroads, A. L., Coats, B. S., Langae, T., ... Stacpoole, P. W. (2013). Long-term safety of dichloroacetate in congenital lactic acidosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, *109*(2), 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.03.019>
- Agosta, F., Al-Chalabi, A., Filippi, M., Hardiman, O., Kaji, R., Meininger, V., ... ALS/MND, T. W. R. G. on. (2015). The El Escorial criteria: Strengths and weaknesses. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, *16*(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.3109/21678421.2014.964258>
- Akbar, M., Essa, M. M., Daradkeh, G., Abdelmegeed, M. A., Choi, Y., Mahmood, L., & Song, B.-J. (2016). Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress. *Brain Research*, *1637*, 34–55. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.016>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). Molecular Biology of The Cell. In *Journal of Chemical Information and Modeling*. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Allaman, I., Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: For better and for worse. *Trends in Neurosciences*, *34*(2), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.12.001>
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, *457*(February), 675–677. <https://doi.org/10.1038/457675a>
- Allen, S. P., Rajan, S., Duffy, L., Mortiboys, H., Higginbottom, A., Grierson, A. J., & Shaw, P. J. (2014). Superoxide dismutase 1 mutation in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis shifts energy generation from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Neurobiology of Aging*, *35*(6), 1499–1509. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.025>
- Almeida, A., Almeida, J., Bolaños, J. P., & Moncada, S. (2001). Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(26), 15294–15299. <https://doi.org/10.1073/pnas.261560998>
- Amici, S. A., Dong, J., & Guerau-de-Arellano, M. (2017). Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia. *Frontiers in Immunology*, *8*(NOV), 1520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01520>
- Anderson, M. A., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience Letters*, *565*, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>
- Andreassen, O. A., Ferrante, R. J., Huang, H.-M., Dedeoglu, A., Park, L., Ferrante, K. L., ... Beal, M. F. (2001). Dichloroacetate exerts therapeutic effects in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Annals of Neurology*, *50*(1), 112–116. <https://doi.org/10.1002/ana.1085>
- Antico Arciuch, V. G., Elguero, M. E., Poderoso, J. J., & Carreras, M. C. (2012). Mitochondrial Regulation of Cell Cycle and Proliferation. *Antioxidants & Redox Signaling*, *16*(10), 1150–1180. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4085>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, *22*(5), 208–215. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6)
- Arganda-Carreras, I., Fernández-González, R., Muñoz-Barrutia, A., & Ortiz-De-Solorzano, C. (2010). 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microscopy Research and Technique*, *73*(11), 1019–1029. <https://doi.org/10.1002/jemt.20829>
- Bannwarth, S., Ait-El-Mkadem, S., Chaussonot, A., Genin, E. C., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., ... Paquis-Flucklinger, V. (2014). A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain*, *137*(8), 2329–2345. <https://doi.org/10.1093/brain/awu138>
- Barbeito, L. H., Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Peluffo, H., Viera, L., ... Beckman, J. S. (2004). A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research Reviews*, *47*(1–3), 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.05.003>

- Barker, R. A. (2016). Neurodegenerative Disease Processes. In R. B. Daroff, J. Jankovic, J. C. Mazziotta, S. L. Pomeroy, & W. G. Bradley (Eds.), *Bradley's neurology in clinical practice* (7th ed., pp. 1342–1348). London ; New York: Elsevier.
- Barnabé-Heider, F., Göritz, C., Sabelström, H., Takebayashi, H., Pfrieger, F. W., Meletis, K., ... Frank, W. (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell*, 7(4), 470–482. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.014>
- Barros, L. F., Brown, A., & Swanson, R. A. (2018). Glia in brain energy metabolism: A perspective. *Glia*, (January), 10–13. <https://doi.org/10.1002/glia.23316>
- Bartolák-Suki, E., Imsirovic, J., Nishibori, Y., Krishnan, R., & Suki, B. (2017). Regulation of mitochondrial structure and dynamics by the cytoskeleton and mechanical factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 7–11. <https://doi.org/10.3390/ijms18081812>
- Beers, D. R., & Appel, S. H. (2019). Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. *The Lancet Neurology*, 18(2), 211–220. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30394-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30394-6)
- Benador, I. Y., Veliova, M., Liesa, M., & Shirihai, O. S. (2019). Mitochondria Bound to Lipid Droplets: Where Mitochondrial Dynamics Regulate Lipid Storage and Utilization. *Cell Metabolism*, 29(4), 827–835. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.011>
- Benard, G., & Rossignol, R. (2008). Ultrastructure of the Mitochondrion and Its Bearing on Function and Bioenergetics. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(8), 1313–1342. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.2000>
- Bendotti, C., Calvaresi, N., Chiveri, L., Prella, A., Moggio, M., Braga, M., ... De Biasi, S. (2001). Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *Journal of the Neurological Sciences*, 191(1–2), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(01\)00627-X](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(01)00627-X)
- Bensimon, G., Lacomblez, L., Meininger, V., & Group, the A. S. (1994). A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 330(9), 585–591. <https://doi.org/10.1056/NEJM199403033300901>
- Boillée, S., Vande Velde, C., & Cleveland, D. W. (2006). ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron*, 52(1), 39–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.018>
- Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kassiotis, G., ... Cleveland, D. W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5778), 1389–1392. <https://doi.org/10.1126/science.1123511>
- Bolaños, J. P. (2016). Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *Journal of Neurochemistry*, 139, 115–125. <https://doi.org/10.1111/jnc.13486>
- Bolaños, J. P., Almeida, A., & Moncada, S. (2010). Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends in Biochemical Sciences*, 35(December), 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.006>
- Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., ... Michelakis, E. D. (2007). A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell*, 11(1), 37–51. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.020>
- Borthwick, G. M., Johnson, M. A., Ince, P. G., Shaw, P. J., & Turnbull, D. M. (1999). Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: Implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Annals of Neurology*, 46(5), 787–790. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199911\)46:5<787::AID-ANA17>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199911)46:5<787::AID-ANA17>3.0.CO;2-8)
- Bossy-Wetze, E., Schwarzenbacher, R., & Lipton, S. A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Medicine*, 10(7), S2. <https://doi.org/10.1038/nm1067>
- Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *The Biochemical Journal/Biochemical Journal*, 435(2), 297–312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>
- Brooks, B. R. (1994). El escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and th. *Journal of the Neurological Sciences*, 124(SUPPL.), 96–107.

[https://doi.org/10.1016/0022-510X\(94\)90191-0](https://doi.org/10.1016/0022-510X(94)90191-0)

- Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., & Munsat, T. L. (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders : Official Publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, 1(5), 293–299. <https://doi.org/DOI.10.1080/146608200300079536>
- Brown, A. M., & Ransom, B. R. (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *GLIA*, Vol. 55, pp. 1263–1271.
- Brown, A. M., & Ransom, B. R. (2014). Astrocyte glycogen as an emergency fuel under conditions of glucose deprivation or intense neural activity. *Metabolic Brain Disease*, 30(1), 233–239. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9588-2>
- Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 377(2), 162–172. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1603471>
- Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A.-P., ... Götz, M. (2008). Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3581–3586. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709002105>
- Bulthuis, E. P., Adjobo-Hermans, M. J. W., Willems, P. H. G. M., & Koopman, W. J. H. (2019). Mitochondrial Morphofunction in Mammalian Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 30(18), 2066–2109. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7534>
- 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*, 22(1), 183–192. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-01-00183.2002>
- Butovsky, O., & Weiner, H. L. (2018). Microglial signatures and their role in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(10), 622–635. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0057-5>
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., ... Barres, B. A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. *Journal of Neuroscience*, 28(1), 264–278. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>
- Calcutt, N. A., Lopez, V. L., Bautista, A. D., Mizisin, L. M., Torres, B. R., Shroads, A. L., ... Peter, W. (2010). Peripheral Neuropathy in Rats Exposed to Dichloroacetate. *Journal of Neuropathol Exp Neurol*, 68(9), 985–993. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181b40217>.Peripheral
- Carlén, M., Meletis, K., Göritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., ... Frisén, J. (2009). Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nature Neuroscience*, 12(3), 259–267. <https://doi.org/10.1038/nn.2268>
- Cassina, A., & Radi, R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 328(2), 309–316. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0178>
- Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de León, A., ... 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>
- Cassina, P., Pehar, M., Vargas, M. R., Castellanos, R., Barbeito, A. G., Estévez, A. G., ... Barbeito, L. (2005). Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 93(1), 38–46. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02984.x>
- Cassina, P., Peluffo, H., Pehar, M., Martínez-Palma, L., Ressa, A., Beckman, J. S., ... Barbeito, L. (2002). Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *Journal of Neuroscience Research*, 67(1), 21–29. <https://doi.org/10.1002/jnr.10107>
- Cellura, E., Spataro, R., Taiello, A. C., & La Bella, V. (2012). Factors affecting the diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 114(6), 550–554. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2011.11.026>
- Chan, D. C. (2012). Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health. *Annual Review of Genetics*,

- 46(1), 265–287. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132529>
- Chandel, N. S. (2015). Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles. *Cell Metabolism*, 22(2), 204–206. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.013>
- Chandler, C. E., Parsons, L. M., Hosang, M., & Shooter, E. M. (1984). A monoclonal antibody modulates the interaction of nerve growth factor with PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 259(11), 6882–6889.
- Chavarría, C., Rodríguez-Bottero, S., Quijano, C., Cassina, P., & Souza, J. M. (2018). Impact of monomeric, oligomeric and fibrillar alpha-synuclein on astrocyte reactivity and toxicity to neurons. *Biochemical Journal*, 475(19), 3153–3169. <https://doi.org/10.1042/bcj20180297>
- Chi, L., Ke, Y., Luo, C., Li, B., Gozal, D., Kalyanaraman, B., & Liu, R. (2006). Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration, and neurogenesis in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Stem Cells*, 24(1), 34–43. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0076>
- Chiu, J., & Dawes, I. W. (2012). Redox control of cell proliferation. *Trends in Cell Biology*, 22(11), 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.08.002>
- Cirulli, E. T., Lasseigne, B. N., Petrovski, S., Sapp, P. C., Dion, P. A., Leblond, C. S., ... Goldstein, D. B. (2015). Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science*, 347(6229), 1436–1441. <https://doi.org/10.1126/science.aaa3650>
- Clarke, L. E., Liddelow, S. A., Chakraborty, C., Münch, A. E., Heiman, M., & Barres, B. A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(8), E1896–E1905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115>
- Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO Journal*, 21(7), 1616–1627. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1616>
- Costa, J., Swash, M., & de Carvalho, M. (2012). Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Archives of Neurology*, 69(11), 1410–1416. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2012.254>
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., ... Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752–758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- de Carvalho, M., Dengler, R., Eisen, A., England, J. D., Kaji, R., Kimura, J., ... Swash, M. (2008). Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clinical Neurophysiology*, 119(3), 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2007.09.143>
- De Giorgio, F., Maduro, C., Fisher, E. M. C., & Acevedo-Arozena, A. (2019). Transgenic and physiological mouse models give insights into different aspects of amyotrophic lateral sclerosis. *Disease Models & Mechanisms*, 12(1), dmm037424. <https://doi.org/10.1242/dmm.037424>
- De Preter, G., Neveu, M.-A., Danhier, P., Brisson, L., Payen, V. L., Porporato, P. E., ... Gallez, B. (2016). Inhibition of the pentose phosphate pathway by dichloroacetate unravels a missing link between aerobic glycolysis and cancer cell proliferation. *Oncotarget*, 7(3), 2910–2920. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6272>
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5), e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- Deberardinis, R. J., & Thompson, C. B. (2012). Cellular metabolism and disease: What do metabolic outliers teach us? *Cell*, 148(6), 1132–1144. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.032>
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., ... Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011>
- Delaney, L. M., Ho, N., Morrison, J., Farias, N. R., Mosser, D. D., & Coomber, B. L. (2015). Dichloroacetate affects proliferation but not survival of human colorectal cancer cells. *Apoptosis*, 20(1), 63–74. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1046-4>
- Deng, J., Yang, M., Chen, Y., Chen, X., Liu, J., Sun, S., ... Wu, J. Y. (2015). FUS Interacts with HSP60 to Promote

- Mitochondrial Damage. *PLoS Genetics*, 11(9), e1005357. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005357>
- Desler, C., Hansen, T. L., Frederiksen, J. B., Marcker, M. L., Singh, K. K., & Juel Rasmussen, L. (2012). Is There a Link between Mitochondrial Reserve Respiratory Capacity and Aging? *Journal of Aging Research*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/192503>
- Díaz-Amarilla, P., Miquel, E., Trostchansky, A., Trías, E., Ferreira, A. M., Freeman, B. A., ... Rubbo, H. (2016). Electrophilic nitro-fatty acids prevent astrocyte-mediated toxicity to motor neurons in a cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis via nuclear factor erythroid 2-related factor activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 95, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.013>
- Díaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trías, E., Cragnolini, A., Martínez-Palma, L., Cassina, P., ... Barbeito, L. (2011). Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44), 18126–18131. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110689108>
- Dienel, G. A. (2017). Lack of appropriate stoichiometry: Strong evidence against an energetically important astrocyte–neuron lactate shuttle in brain. *Journal of Neuroscience Research*, 95(11), 2103–2125. <https://doi.org/10.1002/jnr.24015>
- Ding, W. X., Li, M., Biazik, J. M., Morgan, D. G., Guo, F., Ni, H. M., ... Yin, X. M. (2012). Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure. *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 42373–42378. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.413674>
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D. a, García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703–716. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10380923>
- Dorn, G. W. (2018). Evolving Concepts of Mitochondrial Dynamics. *Annual Review of Physiology*, 81(1), 1–17. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114358>
- Duffy, L. M., Chapman, A. L., Shaw, P. J., & Grierson, A. J. (2011). The role of mitochondria in the pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, (August 2010). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01166.x>
- Dupuis, L. (2014). Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases. *Biochimie*, 100(1), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.033>
- Eraso-Pichot, A., Brasó-Vives, M., Golbano, A., Menacho, C., Claro, E., Galea, E., & Masgrau, R. (2018). GSEA of mouse and human mitochondriomes reveals fatty acid oxidation in astrocytes. *Glia*, 66(8), 1724–1735. <https://doi.org/10.1002/glia.23330>
- Eroglu, C., & Barres, B. A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*, 468(7321), 223–231. <https://doi.org/10.1038/nature09612>
- Eyo, U. B., & Wu, L. J. (2019). Microglia: Lifelong patrolling immune cells of the brain. *Progress in Neurobiology*, 101614. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.04.003>
- FDA. (2017). FDA approves drug to treat ALS | FDA. In *FDA news release*. Retrieved from <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-drug-treat-als>
- Fearon, C., Murray, B., & Mitsumoto, H. (2016). Disorders of Upper and Lower Motor Neurons. In *Bradley's neurology in clinical practice* (7th ed., pp. 1484–1518). London ; New York: Elsevier.
- Figueira, T. R., Barros, M. H., Camargo, A. a, Castilho, R. F., Ferreira, J. C. B., Kowaltowski, A. J., ... Vercesi, A. E. (2013). Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(16), 2029–2074. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4729>
- Frakes, A. E., Braun, L., Ferraiuolo, L., Guttridge, D. C., & Kaspar, B. K. (2017). Additive amelioration of ALS by co-targeting independent pathogenic mechanisms. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 4(2), 76–86. <https://doi.org/10.1002/acn3.375>

- phenotype relationship in amyotrophic lateral sclerosis. In D. H. Geschwind, H. L. Paulson, & C. Klein (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 148, pp. 603–623). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00039-9>
- Graber, D. J., Hickey, W. F., & Harris, B. T. (2010). Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 7, 8. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-8>
- Grimm, A., & Eckert, A. (2017). Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *Journal of Neurochemistry*, 143(4), 418–431. <https://doi.org/10.1111/jnc.14037>
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., ... Siddique, T. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264(5166), 1772–1775. <https://doi.org/10.1126/science.8209258>
- Haidet-Phillips, A. M., Hester, M. E., Miranda, C. J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., ... Kaspar, B. K. (2011). Astrocytes from Familial and Sporadic ALS Patients are Toxic to Motor Neurons. *Nature Biotechnology*, 29(9), 824–828. <https://doi.org/10.1038/nbt.1957>
- Halim, N. D., Mcfate, T., Mohyeldin, A., Okagaki, P., Korotchkina, L. G., Patel, M. S., ... Verma, A. (2010). Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia*, 58(10), 1168–1176. <https://doi.org/10.1002/glia.20996>
- Helle, S. C. J., Kanfer, G., Kolar, K., Lang, A., Michel, A. H., & Kornmann, B. (2013). Organization and function of membrane contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(11), 2526–2541. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2013.01.028>
- Heneka, M. T., Rodríguez, J. J., & Verkhratsky, A. (2010). Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 189–211. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.004>
- Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, 62(9), 1377–1391. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>
- Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L. C., Means, T. K., & El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1896–1905. <https://doi.org/10.1038/nn.3554>
- Higgins, C. M. J., Jung, C., & Xu, Z. (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neuroscience*, 4, 16. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-4-16>
- Hill, B. G., Benavides, G. A., Lancaster Jr, J. R., Ballinger, S., Dell'Italia, L., Zhang, J., & Darley-Usmar, V. M. (2013). Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biological Chemistry*, 393(12), 1485–1512. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0198>
- Hinkle, J. T., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2019). The A1 astrocyte paradigm: New avenues for pharmacological intervention in neurodegeneration. *Movement Disorders*, 34(7), mds.27718. <https://doi.org/10.1002/mds.27718>
- Hooten, K. G., Beers, D. R., Zhao, W., & Appel, S. H. (2015). Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 12(2), 364–375. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0329-3>
- Howland, D. S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N. J., Kim, B., ... Rothstein, J. D. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1604–1609. <https://doi.org/10.1073/pnas.032539299>
- Hüttemann, M., Lee, I., Grossman, L. I., Doan, J. W., & Sanderson, T. H. (2012). Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: Respiration, apoptosis, and human disease. In B. Kadenbach (Ed.), *Mitochondrial oxidative phosphorylation: nuclear-encoded genes, enzyme regulation, and pathophysiology. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 748, pp. 237–264). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_10

- Ibarburu, S., Trías, E., Lago, N., Peluffo, H., Barreto-Núñez, R., Varela, V., ... Barbeito, L. (2017). Focal Transplantation of Aberrant Glial Cells Carrying the SOD1G93A Mutation into Rat Spinal Cord Induces Extensive Gliosis. *NeuroImmunoModulation*, 24(3), 143–153. <https://doi.org/10.1159/000480639>
- Ilieva, H., Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *Journal of Cell Biology*, 187(6), 761–772. <https://doi.org/10.1083/jcb.200908164>
- Islam, M. T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research*, 39(1), 73–82. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>
- Israelson, A., Arbel, N., Da Cruz, S., Ilieva, H., Yamanaka, K., Shoshan-Barmatz, V., & Cleveland, D. W. (2010). Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS. *Neuron*, 67(4), 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.019>
- Iwasaki, Y., Ikeda, K., & Kinoshita, M. (2001). The diagnostic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 2(3), 123–126. <https://doi.org/10.1080/146608201753275571>
- Iyer, S., Subramanian, V., & Acharya, K. R. (2018). C9orf72, a protein associated with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a guanine nucleotide exchange factor. *PeerJ*, 6, e5815. <https://doi.org/10.7717/peerj.5815>
- Jaarsma, D., Haasdijk, E. D., Grashorn, J. A. C., Hawkins, R., Van Duijn, W., Verspaget, H. W., ... Holstege, J. C. (2000). Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SO. *Neurobiology of Disease*, 7(6), 623–643. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0299>
- James, M. O., Cornett, R., Yan, Z., Henderson, G. N., & Stacpoole, P. W. (1997). Glutathione-dependent conversion to glyoxylate, a major pathway of dichloroacetate biotransformation in hepatic cytosol from humans and rats, is reduced in dichloroacetate-treated rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 25(11), 1223–1227.
- James, M. O., Jahn, S. C., Zhong, G., Smeltz, M. G., Hu, Z., & Stacpoole, P. W. (2017). Therapeutic applications of dichloroacetate and the role of glutathione transferase zeta-1. *Pharmacology & Therapeutics*, 170, 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.018>
- James, M. O., & Stacpoole, P. W. (2016). Pharmacogenetic considerations with dichloroacetate dosing. *Pharmacogenomics*, 17(7), 743–753. <https://doi.org/10.2217/pgs-2015-0012>
- Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R., & Brand, M. D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays In Biochemistry*, 47, 53–67. <https://doi.org/10.1042/bse0470053>
- Jellinger, K. A. (2010). Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(3), 457–487. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01010.x>
- Jha, M. K., Jeon, S., & Suk, K. (2012). Pyruvate Dehydrogenase Kinases in the Nervous System: Their Principal Functions in Neuronal-glia Metabolic Interaction and Neuro-metabolic Disorders. *Curr Neuropharmacol*, 10(4), 393–403. <https://doi.org/10.2174/157015912804143586>
- Jha, M. K., Lee, W. H., & Suk, K. (2016, March 1). Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 103, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.11.003>
- Ji, A. L., Zhang, X., Chen, W. W., & Huang, W. J. (2017). Genetics insight into the amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia spectrum. *Journal of Medical Genetics*, 54(3), 145–154. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104271>
- 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(391), 391–401. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2681-1>
- Johnsen, B., Pugdahl, K., Fuglsang-Frederiksen, A., Kollwe, K., Paracka, L., Dengler, R., ... de Carvalho, M. (2019). Diagnostic criteria for amyotrophic lateral sclerosis: A multicentre study of inter-rater variation and sensitivity. *Clinical Neurophysiology*, 130(2), 307–314. <https://doi.org/10.1016/J.CLINPH.2018.11.021>
- Kadenbach, B. (2012). Introduction to mitochondrial oxidative phosphorylation. In B. Kadenbach (Ed.), *Mitochondrial oxidative*

- phosphorylation: nuclear-encoded genes, enzyme regulation, and pathophysiology. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 748, pp. 1–11). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_1
- Kang, S. H., Fukaya, M., Yang, J. K., Rothstein, J. D., & Bergles, D. E. (2010). NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron*, *68*(4), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.009>
- Kang, Y., Fielden, L. F., & Stojanovski, D. (2018). Mitochondrial protein transport in health and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *76*, 142–153. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2017.07.028>
- Kankotia, S., & Stacpoole, P. W. (2014). Dichloroacetate and cancer: New home for an orphan drug? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1846*(2), 617–629. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2014.08.005>
- Kashatus, D. F. (2018). The regulation of tumor cell physiology by mitochondrial dynamics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *500*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.192>
- Kato, M., Li, J., Chuang, J. L., & Chuang, D. T. (2007). Distinct Structural Mechanisms for Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoforms by AZD7545, Dichloroacetate, and Radicol. *Structure*, *15*(8), 992–1004. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.07.001>. Distinct
- Kawamata, H., & Manfredi, G. (2010). Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mechanisms of Ageing and Development*, *131*, 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.05.003>
- Kawamata, H., & Manfredi, G. (2017). Proteinopathies and OXP HOS dysfunction in neurodegenerative diseases. *Journal of Cell Biology*, *216*(12), 3917–3929. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709172>
- Kirk, S. E., Tracey, T. J., Steyn, F. J., & Ngo, S. T. (2019). Biomarkers of Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Neurology*, *10*, 191. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00191>
- Knoechel, T. R., Tucker, A. D., Robinson, C. M., Phillips, C., Taylor, W., Bungay, P. J., ... Brown, D. G. (2006). Regulatory roles of the N-terminal domain based on crystal structures of human pyruvate dehydrogenase kinase 2 containing physiological and synthetic ligands. *Biochemistry*, *45*(2), 402–415. <https://doi.org/10.1021/bi051402s>
- Konrad, C., Kawamata, H., Bredvik, K. G., Arreguin, A. J., Cajamarca, S. A., Hupf, J. C., ... Manfredi, G. (2017). Fibroblast bioenergetics to classify amyotrophic lateral sclerosis patients. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0217-5>
- Korzhevskii, D. E., & Kirik, O. V. (2016). Brain Microglia and Microglial Markers. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, *46*(3), 284–290. <https://doi.org/10.1007/s11055-016-0231-z>
- Kovacs, G. G. (2016). Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2), 189. <https://doi.org/10.3390/ijms17020189>
- Kovacs, M., Trias, E., Varela, V., Ibarburu, S., Beckman, J. S., Moura, I. C., ... Barbeito, L. (2019). CD34 Identifies a Subset of Proliferating Microglial Cells Associated with Degenerating Motor Neurons in ALS. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(16), 3880. <https://doi.org/10.3390/ijms20163880>
- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., & Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, *47*(4), 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004>
- Kritsilis, M., V. Rizou, S., Koutsoudaki, P., Evangelou, K., Gorgoulis, V., Papadopoulos, D., ... Papadopoulos, D. (2018). Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(10), 2937. <https://doi.org/10.3390/ijms19102937>
- Kuznetsov, A. V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P., & Margreiter, R. (2009). The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *41*(10), 1928–1939. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.007>
- Langae, T., Wagner, R., Horne, L. P., Lawson, L. A., Becker, C., Shahin, M., ... Stacpoole, P. W. (2018). Personalized Dosing of Dichloroacetate Using GSTZ1 Clinical Genotyping Assay. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, *22*(4), 266–269. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0261>

- Lattante, S., Ciura, S., Rouleau, G. A., & Kabashi, E. (2015). Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with frontotemporal dementia (FTD). *Trends in Genetics*, 31(5), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.005>
- Leko, M. B., Župunski, V., Kirincich, J., Smilović, D., Hortobágyi, T., Hof, P. R., & Šimić, G. (2019). Molecular mechanisms of neurodegeneration related to C9orf72 hexanucleotide repeat expansion. *Behavioural Neurology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2909168>
- Lewis, P. A., & Spillane, J. E. (2019a). An Introduction to Neurodegeneration. In *The Molecular and Clinical Pathology of Neurodegenerative Disease* (pp. 1–23). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811069-0.00001-x>
- Lewis, P. A., & Spillane, J. E. (2019b). The Motor Neuron Diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *The Molecular and Clinical Pathology of Neurodegenerative Disease* (pp. 157–191). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811069-0.00005-7>
- Li, J., Kato, M., & Chuang, D. T. (2009). Pivotal role of the C-terminal DW-motif in mediating inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase 2 by dichloroacetate. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 34458–34467. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065557>
- Li, Q., Cheng, Z., Zhou, L., Darmanis, S., Neff, N. F., Okamoto, J., ... Barres, B. A. (2019). Developmental Heterogeneity of Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing. *Neuron*, 101(2), 207–223.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.12.006>
- Li, X., Zhang, Y., Ding, J., Wang, M., Li, N., Yang, H., ... Liu, P. (2018). Clinical significance of detecting CSF-derived tumor cells in breast cancer patients with leptomeningeal metastasis. *Oncotarget*, 9(2), 2705–2714. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23597>
- Liao, B., Zhao, W., Beers, D. R., Henkel, J. S., & Appel, S. H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental Neurology*, 237(1), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.011>
- Liddelow, S. A., Gattenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Liu, P. S., & Ho, P. C. (2018). Mitochondria: A master regulator in macrophage and T cell immunity. *Mitochondrion*, 41, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.11.002>
- Liu, X., & Hajnóczky, G. (2011). Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. *Cell Death and Differentiation*, 18(10), 1561–1572. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.13>
- Lobo-Jarne, T., & Ugalde, C. (2018). Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 76, 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.021>
- Lobsiger, C. S., & Cleveland, D. W. (2007). Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1355–1360. <https://doi.org/10.1038/nn1988>
- Long, Q., Zhao, D., Fan, W., Yang, L., Zhou, Y., Qi, J., ... Liu, X. (2015). Modeling of Mitochondrial Donut Formation. *Biophysical Journal*, 109(5), 892–899. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.07.039>
- Lovatt, D., Sonnewald, U., Waagepetersen, H. S., Schousboe, A., He, W., Lin, J. H. C., ... Nedergaard, M. (2007). The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *Journal of Neuroscience*, 27(45), 12255–12266. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3404-07.2007>
- Magistretti, P. J. (2010). *Neuron – glia metabolic coupling and plasticity*. 407–410. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2010.053157>
- Magnus, T., Carmen, J., Deleon, J., Xue, H., Pardo, A. C., Lepore, A. C., ... Maragakis, N. J. (2008). Adult glial precursor proliferation in mutant SOD1G93A mice. *GLIA*, 56(2), 200–208. <https://doi.org/10.1002/glia.20604>
- Magrané, J., Cortez, C., Gan, W. B., & Manfredi, G. (2014). Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Human Molecular Genetics*, 23(6), 1413–1424. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt528>

- Magrané, J., Hervias, I., Henning, M. S., Damiano, M., Kawamata, H., & Manfredi, G. (2009). Mutant SOD1 in neuronal mitochondria causes toxicity and mitochondrial dynamics abnormalities. *Human Molecular Genetics*, 18(23), 4552–4564. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp421>
- Majounie, E., Renton, A. E., Mok, K., Dopper, E. G., Waite, A., Rollinson, S., ... Logroscino, G. (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: A cross-sectional study. *The Lancet Neurology*, 11(4), 323–330. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70043-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70043-1)
- Mammoser, A. G., & Groves, M. D. (2010). Biology and therapy of neoplastic meningitis. *Current Oncology Reports*, 12(1), 41–49. <https://doi.org/10.1007/s11912-009-0079-2>
- Manfredi, G., & Xu, Z. (2005). Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion*, 5(2), 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2005.01.002>
- Martínez, J., Tarallo, D., Martínez-Palma, L., Victoria, S., Bresque, M., Rodríguez-Bottero, S., ... Quijano, C. (2019). Mitofusins modulate the increase in mitochondrial length, bioenergetics and secretory phenotype in therapy-induced senescent melanoma cells. *The Biochemical Journal*, BCJ20190405. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190405>
- Masgrau, R., Guaza, C., Ransohoff, R. M., & Galea, E. (2017). Should We Stop Saying 'Glia' and 'Neuroinflammation'? *Trends in Molecular Medicine*, 23(6), 486–500. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.04.005>
- Matias, I., Morgado, J., & Gomes, F. C. A. (2019). Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 59. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C. D., Martushova, K., Kiaei, M., Flint Beal, M., & Manfredi, G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 29626–29633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203065200>
- Matyash, V., & Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.12.001>
- Michelakis, E. D., Sutendra, G., Dromparis, P., Webster, L., Haromy, A., Niven, E., ... Petruk, K. C. (2010). Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Science Translational Medicine*, 2(31), 31ra34. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000677>
- Migheli, A., Cordera, S., Bendotti, C., Atzori, C., Piva, R., & Schiffer, D. (1999). S-100b protein is upregulated in astrocytes and motor neurons in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 261, 25–28.
- Miller, A. M., Shah, R. H., Pentsova, E. I., Pourmaleki, M., Briggs, S., Distefano, N., ... Mellingshoff, I. K. (2019). Tracking tumour evolution in glioma through liquid biopsies of cerebrospinal fluid. *Nature*, 565(7741), 654–658. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0882-3>
- Miller, R. G., Mitchell, J. D., & Moore, D. H. (2012). *Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ motor neuron disease (MND) (Review)*. (3), 191–2016.
- Miller, R. G., Munsat, T. L., Swash, M., & Brooks, B. R. (1999). Consensus guidelines for the design and implementation of clinical trials in ALS. World Federation of Neurology committee on Research. *Journal of the Neurological Sciences*, 169(1–2), 2–12. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(99\)00209-9](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(99)00209-9)
- Miquel, E., Cassina, A., Martínez-Palma, L., Bolatto, C., Trías, E., Gandelman, M., ... Cassina, P. (2012). Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, 7(4), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034776>
- Miquel, E., Cassina, A., Martínez-Palma, L., Souza, J. M., Bolatto, C., Rodríguez-Bottero, S., ... Cassina, P. (2014). Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 70, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.019>
- Mishra, P., & Chan, D. C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(10), 634–646. <https://doi.org/10.1038/nrm3877>
- Mishra, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *Journal of Cell Biology*, 212(4), 379–387.

<https://doi.org/10.1083/jcb.201511036>

- Miyazono, Y., Hirashima, S., Ishihara, N., Kusakawa, J., Nakamura, K.-I., & Ohta, K. (2018). Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner. *Scientific Reports*, 8(1), 350. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18582-6>
- Mosser, C. A., Baptista, S., Arnoux, I., & Audinat, E. (2017). Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Progress in Neurobiology*, 149–150, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.01.002>
- Murley, A., & Nunnari, J. (2016). The Emerging Network of Mitochondria-Organelle Contacts. *Molecular Cell*, 61(5), 648–653. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.031>
- Murphy-Royal, C., Dupuis, J., Groc, L., & Oliet, S. H. R. (2017). Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission. *Journal of Neuroscience Research*, 95(11), 2140–2151. <https://doi.org/10.1002/jnr.24029>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Myoung, J. C., & Suh, Y. L. (2002). Ultrastructural changes of mitochondria in the skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastructural Pathology*, 26(1), 3–7. <https://doi.org/10.1080/01913120252934260>
- Nagai, M., Re, D. B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T. M., Wichterle, H., & Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nature Neuroscience*, 10(5), 615–622. <https://doi.org/10.1038/nn1876>
- Nair, S., Sobotka, K. S., Joshi, P., Gressens, P., Fleiss, B., Thornton, C., ... Hagberg, H. (2019). Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response in vitro and in vivo. *Glia*, 67(6), 1047–1061. <https://doi.org/10.1002/glia.23587>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). *Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo — Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo — Supporting Online Material*. 308(May), 1314–1319. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. *Cell*, 148(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
- O'Hara, D., Davis, G. M., Adlesic, N. A., Hayes, J. M., & Davey, G. P. (2019). Dichloroacetate Stabilizes Mitochondrial Fusion Dynamics in Models of Neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12(September), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00219>
- Oberheim Bush, N. A., & Nedergaard, M. (2017). Do Evolutionary Changes in Astrocytes Contribute to the Computational Power of the Hominid Brain? *Neurochemical Research*, 42(9), 2577–2587. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2363-0>
- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in Molecular Biology*, 814, 23–45. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3
- Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in Neurosciences*, 29(10), 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.08.004>
- Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology*, 173(4), 649–665. <https://doi.org/10.1111/bph.13139>
- Orrenius, S., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 143–183. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105122>
- Osellame, L. D., Blacker, T. S., & Duchon, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 26(6), 711–723. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>
- Ott, M., Amunts, A., & Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual Review of*

- Biochemistry*, 85(1), 77–101. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014334>
- Paganoni, S., Macklin, E. A., Lee, A., Murphy, A., Chang, J., Zipf, A., ... Atassi, N. (2014). Diagnostic timelines and delays in diagnosing amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 15(5–6), 453–456. <https://doi.org/10.3109/21678421.2014.903974>
- Pagliuso, A., Cossart, P., & Stavru, F. (2018). The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 75(3), 355–374. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2603-0>
- Palade, G. E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 1(4), 188–211. <https://doi.org/10.1177/1.4.188>
- Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S. T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., ... René, F. (2015). A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Mol Med*, 7(5), 526–546. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404433>
- Palese, F., Sartori, A., Logroscino, G., & Pisa, F. E. (2019). Predictors of diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis: a cohort study based on administrative and electronic medical records data. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 20(3–4), 176–185. <https://doi.org/10.1080/21678421.2018.1550517>
- Palomo, G. M., & Manfredi, G. (2014). Exploring new pathways of neurodegeneration in ALS: The role of mitochondria quality control. *Brain Research*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.065>
- Park, J., Choi, H., Min, J. S., Park, S. J., Kim, J. H., Park, H. J., ... Lee, D. S. (2013). Mitochondrial dynamics modulate the expression of pro-inflammatory mediators in microglial cells. *Journal of Neurochemistry*, 127(2), 221–232. <https://doi.org/10.1111/jnc.12361>
- Pasinelli, P., Belford, M. E., Lennon, N., Bacskai, B. J., Hyman, B. T., Trotti, D., & Brown, R. H. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron*, 43, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.021>
- Pehar, M., Martínez-Palma, L., Peluffo, H., Kamaid, A., Cassina, P., & Barbeito, L. (2002). Peroxynitrite-induced cytotoxicity in cultured astrocytes is associated with morphological changes and increased nitrotyrosine immunoreactivity. *Neurotoxicity Research*, 4(2), 87–93. <https://doi.org/10.1080/10298420290015818>
- Philips, T., & Rothstein, J. D. (2015). Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Current Protocols in Pharmacology*, 2015, 5.67.1-5.67.21. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0567s69>
- Picard, M., & McManus, M. J. (2016). Mitochondrial signaling and neurodegeneration. In *Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Disorders: Second Edition* (pp. 107–137). https://doi.org/10.1007/978-3-319-28637-2_5
- Polyzos, A. A., & McMurray, C. T. (2017). The chicken or the egg: mitochondrial dysfunction as a cause or consequence of toxicity in Huntington's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 161, 181–197. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2016.09.003>
- Porter, R. K. (2012). Studies on the function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins. In B. Kadenbach (Ed.), *Mitochondrial oxidative phosphorylation: nuclear-encoded genes, enzyme regulation, and pathophysiology. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 748, pp. 171–184). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_7
- Prabhu, A., Sarcar, B., Miller, C. R., Kim, S. H., Nakano, I., Forsyth, P., & Chinnaiyan, P. (2015). Ras-mediated modulation of pyruvate dehydrogenase activity regulates mitochondrial reserve capacity and contributes to glioblastoma tumorigenesis. *Neuro-Oncology*, 17(9), 1220–1230. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou369>
- Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S. S., & Ransohoff, R. M. (2011). Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 13(10), 1227–1235. <https://doi.org/10.1038/nn.2923>
- Quijano, C., Trujillo, M., Castro, L., & Trostchansky, A. (2016). Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biology*, 8, 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.11.010>
- Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., & Castro, L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(11), 1451–1464. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01111-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01111-5)

- Rahimi, J., & Woehrer, A. (2018). Overview of cerebrospinal fluid cytology. In G. G. Kovacs & I. Alafuzoff (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology, Neuropathology* (Vol. 145, pp. 563–571). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00035-3>
- Rahman, J., & Rahman, S. (2018). Mitochondrial medicine in the omics era. *Lancet (London, England)*, *391*(10139), 2560–2574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30727-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30727-X)
- Rambold, A. S., Cohen, S., & Lippincott-Schwartz, J. (2015). Fatty acid trafficking in starved cells: Regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Developmental Cell*, *32*(6), 678–692. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.029>
- Rambold, A. S., & Pearce, E. L. (2018). Mitochondrial Dynamics at the Interface of Immune Cell Metabolism and Function. *Trends in Immunology*, *39*(1), 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.006>
- Rampelt, H., Zerbes, R. M., van der Laan, M., & Pfanner, N. (2017). Role of the mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1864*(4), 737–746. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.05.020>
- Ransohoff, R. M. (2016a). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, *19*(8), 987–991. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>
- Ransohoff, R. M. (2016b). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science (New York, N.Y.)*, *353*(6301), 777–783. <https://doi.org/10.1126/science.aag2590>
- Re, D. B., Le Verche, V., Yu, C., Amoroso, M. W., Politi, K. A., Phani, S., ... Przedborski, S. (2014). Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron*, *81*(5), 1001–1008. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.011>
- Reddy, P. H., & Reddy, T. P. (2011). Mitochondria as a therapeutic target for aging and neurodegenerative diseases. *Current Alzheimer Research*, *8*(4), 393–409. <https://doi.org/10.2174/156720511795745401>
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., ... Traynor, B. J. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, *72*(2), 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.010>
- Richard, J.-P., & Maragakis, N. J. (2015). Induced pluripotent stem cells from ALS patients for disease modeling. *Brain Research*, *1607*, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.017>
- Rinaldi, F., Motti, D., Ferraiuolo, L., & Kaspar, B. K. (2017). High content analysis in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *80*, 180–191. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.12.001>
- Rodríguez-Bottero, S., Chavarría, C., Martínez-Palma, L., Lecumberry, F., Olivera-Pasilio, V., Ramos, M., ... Cassina, P. (2016). Análisis estructural de la red mitocondrial en células vinculadas a la patología de enfermedades neurodegenerativas. *Congreso Latinoamericano de Investigación y Educación Superior Interdisciplinaria*.
- Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A., & Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology*, *27*(21), R1177–R1192. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015>
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., ... Brown, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, *362*(6415), 59–62. <https://doi.org/10.1038/362059a0>
- Rosenblum, L. T., & Trotti, D. (2017). EAAT2 and the Molecular Signature of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Advances in Neurobiology*, *16*, 117–136. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55769-4_6
- Rutter-Locher, Z., Turner, M. R., Leigh, P. N., & Al-Chalabi, A. (2016). Analysis of terms used for the diagnosis and classification of amyotrophic lateral sclerosis and motor neuron disease. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, *17*(7–8), 600–604. <https://doi.org/10.1080/21678421.2016.1181766>
- Saneto, R. P., & De Vellis, J. (1987). Neuronal and glial cells: cell culture of the central nervous system. In A. Turner & H. Brachelard (Eds.), *Neurochemistry: a Practical Approach*. (pp. 27–63). Oxford: IRL Press.

- Sasaki, S. (2010). Determination of altered mitochondria ultrastructure by electron microscopy. In P. Bross & N. Gregersen (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 648, pp. 279–290). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-756-3_19
- Sasaki, S., Aoki, M., Nagai, M., Kobayashi, M., & Itoyama, Y. (2009). Mitochondrial alterations in transgenic mice with an H46R mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 68(4), 365–373. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31819ba185>
- Sasaki, S., & Iwata, M. (2007). Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(1), 10–16. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31802c396b>
- Savage, J. C., Carrier, M., & Tremblay, M.-È. (2019). Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease. In O. Garaschuk & A. Verkhratsky (Eds.), *Microglia. Methods in Molecular Biology* (Vol. 2034, pp. 13–26). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9658-2_2
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., ... Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, 74(4), 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., & Sonnewald, U. (2019). Astrocytic pyruvate carboxylation: Status after 35 years. *Journal of Neuroscience Research*, 97(8), 890–896. <https://doi.org/10.1002/jnr.24402>
- Seo, B., Yoon, S., & Do, J. (2018). Mitochondrial Dynamics in Stem Cells and Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3893. <https://doi.org/10.3390/ijms19123893>
- Serasinghe, M. N., & Chipuk, J. E. (2017). Mitochondrial Fission in Human Diseases. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 240, 159–188. https://doi.org/10.1007/164_2016_38
- Silvin, A., & Ginhoux, F. (2018). Microglia heterogeneity along a spatio-temporal axis: More questions than answers. *GLIA*, 66(10), 2045–2057. <https://doi.org/10.1002/glia.23458>
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 24(8), 1583. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>
- Smith, E. F., Shaw, P. J., & De Vos, K. J. (2017). The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.052>
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638–647. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>
- 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>
- Sotelo-Silveira, J. R., Lepanto, P., Elizondo, V., Horjales, S., Palacios, F., Martínez-Palma, L., ... Barbeito, L. (2009). Axonal mitochondrial clusters containing mutant SOD1 in transgenic models of ALS. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(7), 1535–1545. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2614>
- Sousa, J. S., D'Imprima, E., & Vonck, J. (2018). Mitochondrial respiratory chain complexes. In J. R. Harris & E. J. Boekema (Eds.), *Subcellular Biochemistry* (Vol. 87, pp. 167–227). https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_7
- Stacpoole, P. W. (2017). Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(11), 1–14. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx071>
- Stacpoole, P. W., Gilbert, L. R., Neiberger, R. E., Carney, P. R., Valenstein, E., Theriaque, D. W., & Shuster, J. J. (2008). Evaluation of long-term treatment of children with congenital lactic acidosis with dichloroacetate. *Pediatrics*, 121(5), e1223–e1228. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-2062>
- Stacpoole, P. W., Kurtz, T. L., Han, Z., & Langaee, T. (2008). Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(13–14), 1478–1487. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.02.014>
- Stephenson, J., Nutma, E., van der Valk, P., & Amor, S. (2018). Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*, 154(2), 204–219. <https://doi.org/10.1111/imm.12922>

- Stockwin, L. H., Yu, S. X., Borgel, S., Hancock, C., Wolfe, T. L., Phillips, L. R., ... Newton, D. L. (2010). Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *International Journal of Cancer*, 127(11), 2510–2519. <https://doi.org/10.1002/ijc.25499>
- Stratoulialis, V., Venero, J. L., Tremblay, M.-È., & Joseph, B. (2019). Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *The EMBO Journal*, 38(17). <https://doi.org/10.15252/embj.2019101997>
- Strong, M. J., Abrahams, S., Goldstein, L. H., Woolley, S., Mclaughlin, P., Snowden, J., ... Turner, M. R. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis - frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): Revised diagnostic criteria. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 18(3–4), 153–174. <https://doi.org/10.1080/21678421.2016.1267768>
- Sun, X., Cao, H., Zhan, L., Yin, C., Wang, G., Liang, P., ... Xing, J. (2018). Mitochondrial fission promotes cell migration by Ca²⁺/CaMKII/ERK/FAK pathway in hepatocellular carcinoma. *Liver International*. <https://doi.org/10.1111/liv.13660>
- Talbot, E., Malek, A., & Lacomis, D. (2016). The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. In *Neuroepidemiology* (1st ed., Vol. 138). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802973-2.00013-6>
- Tan, W., Pasinelli, P., & Trotti, D. (2014). Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(8), 1295–1301. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.02.009>
- Tay, T. L., Savage, J. C., Hui, C. W., Bisht, K., & Tremblay, M.-È. (2017). Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *The Journal of Physiology*, 595(6), 1929–1945. <https://doi.org/10.1113/JP272134>
- The writing group on behalf of Edaravone (MCI-186) ALS 18 Study. (2017). Exploratory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis (Japan ALS severity classification: Grade 3, requiring assistance for eating, excretion or ambulation). *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 18(sup1), 40–48. <https://doi.org/10.1080/21678421.2017.1361441>
- The writing group on behalf of the Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study. (2017). Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, 16(7), 505–512. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30115-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30115-1)
- Trías, E., Díaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Isasi, E., Drechsel, D. A., Lopez, N., ... Barbeito, L. (2013). Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(December), 274. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00274>
- Trías, E., Ibarburu, S., Barreto-Núñez, R., Babdor, J., Maciel, T. T., Guillo, M., ... Barbeito, L. (2016). Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0620-9>
- Trías, E., Ibarburu, S., Barreto-Núñez, R., & Barbeito, L. (2016). Significance of aberrant glial cell phenotypes in pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 636, 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.07.052>
- Trostchansky, A., Mastrogiovanni, M., Miquel, E., Rodríguez-Bottero, S., Martínez-Palma, L., Cassina, P., & Rubbo, H. (2018). Profile of Arachidonic Acid-Derived Inflammatory Markers and Its Modulation by Nitro-Oleic Acid in an Inherited Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 131. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00131>
- Valbuena, G. N., Tortarolo, M., Bendotti, C., Cantoni, L., & Keun, H. C. (2017). Altered metabolic profiles associate with toxicity in SOD1G93Aastrocyte-neuron co-cultures. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00072-4>
- Valcarcel-Jimenez, L., Gaude, E., Torrano, V., Frezza, C., & Carracedo, A. (2017). Mitochondrial Metabolism: Yin and Yang for Tumor Progression. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 28(10), 748–757. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.06.004>
- Valente, A. J., Maddalena, L. A., Robb, E. L., Moradi, F., & Stuart, J. A. (2017). A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture. *Acta Histochemica*, 119(3), 315–326. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2017.03.001>

- Van Damme, P., Robberecht, W., & Van Den Bosch, L. (2017). Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. *Disease Models & Mechanisms*, 10(5), 537–549. <https://doi.org/10.1242/dmm.029058>
- van den Berg, L. H., Sorenson, E., Gronseth, G., Macklin, E. A., Andrews, J., Baloh, R. H., ... Airlie House ALS Clinical Trials Guidelines Group, for the A. H. A. C. T. G. (2019). Revised Airlie House consensus guidelines for design and implementation of ALS clinical trials. *Neurology*, 92(14), e1610–e1623. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000007242>
- Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., & Robberecht, W. (2006). The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1762(11–12), 1068–1082. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.05.002>
- Van den Bossche, J., & Saraber, D. L. (2018). Metabolic regulation of macrophages in tissues. *Cellular Immunology*, 330, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.009>
- van der Bliek, A. M., Shen, Q., & Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011072>
- van der Laan, M., Horvath, S. E., & Pfanner, N. (2016). Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Current Opinion in Cell Biology*, 41, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.03.013>
- van der Zee, J., Gijssels, I., Dillen, L., Van Langenhove, T., Theuns, J., Engelborghs, S., ... Cavallaro, T. (2013). A Pan-European Study of the C9orf72 Repeat Associated with FTL: Geographic Prevalence, Genomic Instability, and Intermediate Repeats. *Human Mutation*, 34(2), 363–373. <https://doi.org/10.1002/humu.22244>
- van Es, M. A., Hardiman, O., Chio, A., Al-chalabi, A., Pasterkamp, R. J., Veldink, J. H., & van den Berg, L. H. Van Den. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*, 6736(17), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31287-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31287-4)
- Vande Velde, C., McDonald, K. K., Boukhedimi, Y., McAlonis-Downes, M., Lobsiger, C. S., Hadj, S. B., ... Cleveland, D. W. (2011). Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. *PLoS ONE*, 6(7), e22031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022031>
- Vargas, M. R., Johnson, D. A., Sirkis, D. W., Messing, A., & Johnson, J. A. (2008). Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(50), 13574–13581. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4099-08.2008>
- Vargas, M. R., Pehar, M., Cassina, P., Beckman, J. S., & Barbeito, L. (2006). Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 97(3), 687–696. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03742.x>
- Vargas, M. R., Pehar, M., Cassina, P., Martínez-Palma, L., Thompson, J. A., Beckman, J. S., & Barbeito, L. (2005). Fibroblast growth factor-1 induces heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in spinal cord astrocytes: Consequences for motor neuron survival. *Journal of Biological Chemistry*, 280(27), 25571–25579. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501920200>
- Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure & Function*, 222(5), 2017–2029. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>
- Vázquez, C., Ketzoián, C., Legnani, C., Rega, I., Sánchez, N., Perna, A., ... Medici, M. (2008). Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in Uruguay: A population-based study. *Neuroepidemiology*, 30(2), 105–111. <https://doi.org/10.1159/000120023>
- Verkhatsky, A. (2010). Physiology of neuronal-glia networking. *Neurochemistry International*, 57, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.02.002>
- Verkhatsky, A., & Kirchhoff, F. (2007). Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *Journal of Anatomy*, 210(6), 651–660. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00734.x>
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Voloboueva, L. A., Emery, J. F., Sun, X., & Giffard, R. G. (2013). Inflammatory response of microglial BV-2 cells includes a

- glycolytic shift and is modulated by mitochondrial glucose-regulated protein 75/mortalin. *FEBS Letters*, 587(6), 756–762. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.067>
- Voloboueva, L. A., Suh, S. W., Swanson, R. A., & Giffard, R. G. (2007). Inhibition of mitochondrial function in astrocytes: Implications for neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*, 102(4), 1383–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04634.x>
- Wang, W., Li, L., Lin, W. L., Dickson, D. W., Petrucelli, L., Zhang, T., & Wang, X. (2013). The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Human Molecular Genetics*, 22(23), 4706–4719. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt319>
- Wang, W., Wang, L., Lu, J., Siedlak, S. L., Fujioka, H., Liang, J., ... Wang, X. (2016). The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. *Nature Medicine*, 22(8), 869–878. <https://doi.org/10.1038/nm.4130>
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *The Journal of General Physiology*, 8(6), 519–530. <https://doi.org/10.1097/00000441-193107000-00022>
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(12), 872–884. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
- Weston, C. L., Glantz, M. J., & Connor, J. R. (2011). Detection of cancer cells in the cerebrospinal fluid: current methods and future directions. *Fluids and Barriers of the CNS*, 8(1), 14. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-14>
- Whitehouse, S., Cooper, R. H., & Randle, P. J. (1974). Mechanism of activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate and other halogenated carboxylic acids. *Biochemical Journal*, 141(3), 761–774. <https://doi.org/10.1042/bj1410761>
- Wiedemann, F. R., Manfredi, G., Mawrin, C., Flint Beal, M., & Schon, E. A. (2002). Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *Journal of Neurochemistry*, 80(4), 616–625. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00731.x>
- Wiedemann, F. R., Winkler, K., Kuznetsov, A. V., Bartels, C., Vielhaber, S., Feistner, H., & Kunz, W. S. (1998). Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 156(1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(98\)00008-2](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(98)00008-2)
- Willems, P. H. G. M., Rossignol, R., Dieteren, C. E. J., Murphy, M. P., & Koopman, W. J. H. (2015). Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Cell Metabolism*, 22(2), 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.006>
- Wollweber, F., von der Malsburg, K., & van der Laan, M. (2017). Mitochondrial contact site and cristae organizing system: A central player in membrane shaping and crosstalk. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(9), 1481–1489. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.004>
- Wu, S., Zhou, F., Zhang, Z., & Xing, D. (2011). Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. *FEBS Journal*, 278(6), 941–954. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08010.x>
- Wu, Y., Chen, M., & Jiang, J. (2019). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and drug targets via apoptotic signaling. *Mitochondrion*. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.07.003>
- Xiao, Q., Zhao, W., Beers, D. R., Yen, A. A., Xie, W., Henkel, J. S., & Appel, S. H. (2007). Mutant SOD1 G93A microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *Journal of Neurochemistry*, 102(6), 2008–2019. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04677.x>
- Yamanaka, K., Chun, S. J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D. H., ... Cleveland, D. W. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, 11(3), 251–253. <https://doi.org/10.1038/nn2047>
- Yamasaki, R., Lu, H., Butovsky, O., Ohno, N., Rietsch, A. M., Cialic, R., ... Ransohoff, R. M. (2014). Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(8), 1533–1549. <https://doi.org/10.1084/jem.20132477>
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive

- astrogliosis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(18), 6391–6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O'Keefe, S., ... Wu, J. Q. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(36), 11929–11947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>
- Zhang, Y., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. A., Blumenthal, P. D., ... Barres, B. A. (2016). Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*, 89(1), 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>
- Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. Bin. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(1), 3–15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>
- Zoccolella, S., Beghi, E., Palagano, G., Fraddosio, A., Samarelli, V., Lamberti, P., ... Logroscino, G. (2006). Predictors of delay in the diagnosis and clinical trial entry of amyotrophic lateral sclerosis patients: A population-based study. *Journal of the Neurological Sciences*, 250(1–2), 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.06.027>
- Zong, W.-X., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2016). Mitochondria and Cancer. *Molecular Cell*, 61(5), 667–676. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.011>