

# Imagenología funcional mitocondrial en monocitos sanguíneos: estudio en individuos sanos y portadores de Esclerosis Lateral Amiotrófica

Erik Winiarski<sup>1</sup>, Laura Martínez-Palma<sup>1</sup>, Andreina Brugnini<sup>2</sup>, Natalia Trias<sup>2</sup>, Daniela Lens<sup>2</sup>, Adriana Cassina<sup>3</sup>, Patricia Cassina<sup>1</sup>, Federico Lecumberry<sup>4</sup>.

1- Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República; 2- Laboratorio de Citometría y Biología Celular y Molecular, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República; 3- Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República; 4- Departamento de Procesamiento de Señales, Instituto de Ingeniería Eléctrica, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República.

## INTRODUCCION

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las motoneuronas corticales y espinales para la cual no existen métodos paraclínicos específicos para diagnóstico y seguimiento<sup>1</sup>. Su patogenia no está claramente definida, pero muchos de los mecanismos propuestos involucran a la mitocondria. Alteraciones en la función y morfología mitocondrial se han encontrado en varios tipos celulares<sup>2,3,4,5,6</sup> en modelos animales y pacientes. Sin embargo, aunque se ha demostrado participación del sistema inmunitario, la red mitocondrial en las células del sistema inmune periférico de individuos con ELA no ha sido estudiada. En este proyecto proponemos estudiar las poblaciones de monocitos, establecer un patrón descriptor de su morfología mitocondrial y compararlo con su función (imagenología funcional) en individuos sanos e individuos afectados por la ELA. Se pretende también, y establecer si existe una correlación con la escala funcional evolutiva de los pacientes. La valoración de biomarcadores en muestras de sangre es ventajosa por la facilidad de obtención de la muestra.

## METODOLOGIA

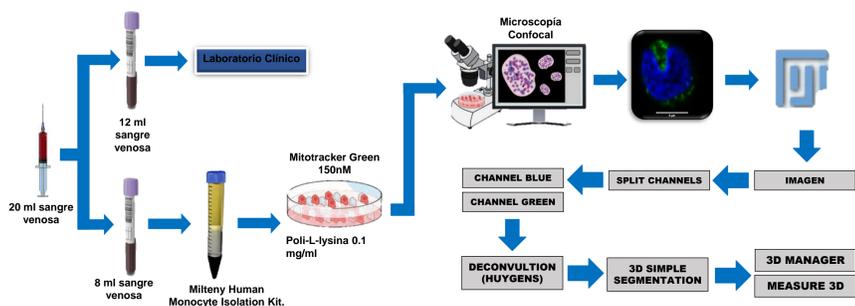


Figura 1. Diagrama de la metodología utilizada.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de individuos sanos y afectados por la ELA, de las cuales una fracción se destinó al análisis de laboratorio. En la fracción enriquecida en monocitos se analizó la morfología mitocondrial en imágenes (stacks en el eje Z) adquiridas por microscopía confocal de los monocitos marcados con sondas mitocondriales fluorescentes. Para el análisis morfológico se utilizó el software libre de análisis y procesamiento de imágenes Fiji<sup>7</sup>.

## CONCLUSIONES Y DISCUSION

- Se automatizó un método de cuantificación morfológico minucioso y estandarizado de la red mitocondrial a partir de la observación por microscopía confocal in vivo de monocitos sanguíneos.
- El análisis morfológico de la red mitocondrial de los monocitos de individuos afectados por la ELA presentan una mayor fragmentación, tal como se ha observado en las células del sistema nervioso central.

## Referencias

- [1] Al Chalabi, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 2017; 377:162–172
- [2] Cassina P, et al. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. J Neurosci. 2008
- [3] Miquel E, et al. Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis. PLoS One. 2012.
- [4] Miquel E, et al. Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. Free Radic Biol Med. 2014
- [5] Martínez-Palma L, et al. Mitochondrial Modulation by Dichloroacetate Reduces Toxicity of Aberrant Glial Cells and Gliosis in the SOD1G93A Rat Model of ALS. Neurotherapeutics. 2019
- [6] Brand y Nicholls. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. Biochemistry Journal. Nature Method. 2011.
- [7] Schindelin, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. 2012

## RESULTADOS

Se desarrolló un plugin en el software Fiji para automatizar la segmentación y cuantificación de las mitocondrias de los monocitos (Figs. 1 y 2), y permitir una validación por parte del especialista para luego extraer descriptores de forma y parámetros morfológicos en aquellas mitocondrias validadas. Estandarizamos un método que produjo parámetros descriptores de interés como el volumen y la superficie mitocondrial total e individual, y otros parámetros de conjunto como la distribución y complejidad de la red mitocondrial. Los datos preliminares indican un aumento en la fragmentación mitocondrial en los individuos portadores de ELA analizados comparados con los controles (Fig 2).

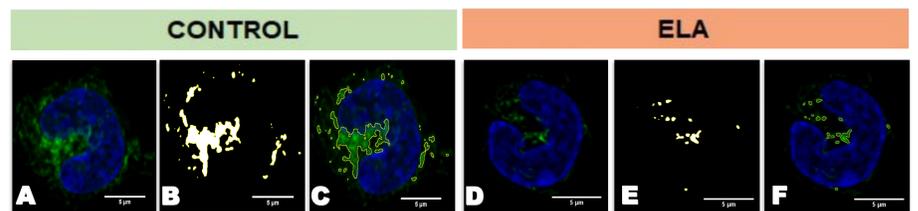


Figura 2. Procesamiento de imágenes a partir de microfotografías de fluorescencia confocal de monocitos sanguíneos de individuos sanos y afectados por la ELA.

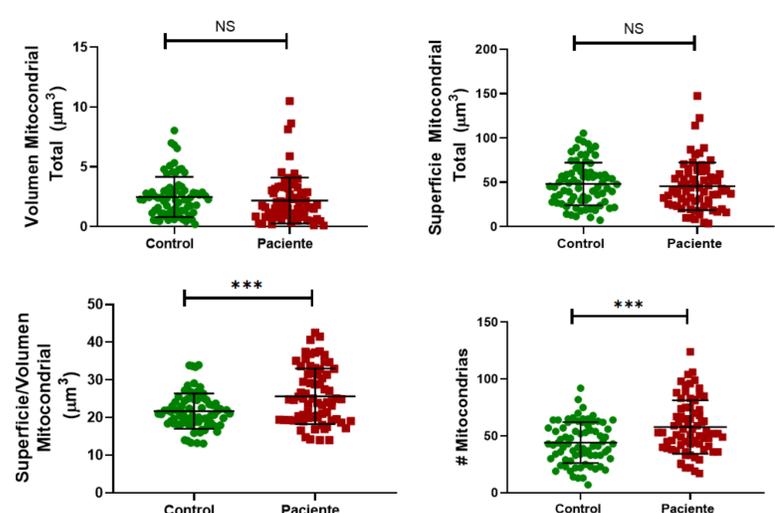


Figura 3. Diagrama de dispersión de las variables que describen los parámetros morfológicos de los monocitos de los individuos afectados por ELA y los individuos sanos. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de las células obtenidas de los pacientes (símbolos rojos) o los individuos sanos (símbolos verdes). Significancia  $P < 0.001$  (\*\*\*).

- El análisis de la correlación entre la morfología funcional mitocondrial de los monocitos y la escala de valoración funcional de los individuos con ELA, aportará datos que pueden ser de utilidad como biomarcador de la patología o para evaluar la respuesta a eventuales tratamientos.

