



**Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)**

**Área Biología**

**Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas**



**UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY**

**INTERACCIÓN ASTROCITO-NEURONA EN ESCLEROSIS LATERAL  
AMIOTRÓFICA: ESTRATEGIAS PARA INHIBIR LA MUERTE NEURONAL**

**Mag. Ernesto Miquel**

Orientadora: Dra. Patricia Cassina

Tribunal

Dr. Carlos Escande (Presidente)

Dra. Giselle Prunell (Vocal)

Dr. Javier Ramos (Vocal)

Departamento de Histología y Embriología

Facultad de Medicina

Universidad de la República

Agosto 2022

## AGRADECIMIENTOS

A Patricia, por la paciencia, la confianza, el apoyo y todo lo aprendido durante estos años.

Al Dr. Carlos Escande, la Dra. Giselle Prunell y el Dr. Javier Ramos por acceder a ser parte del tribunal de esta tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular. De una u otra manera todos aportaron para que pudiera terminar esta etapa. En especial a Rosalía, Laura y Patricia, por sus aportes a los trabajos que formaron parte de esta tesis.

A todos los compañeros del Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina.

A Adriana Cassina, por su apoyo y discusiones sobre la mitocondria.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO) de la Facultad de Medicina, donde pude realizar gran parte de los experimentos de este trabajo.

A Mariana Pehar, por su asistencia con la espectrometría de masa y proteómica de exosomas.

A Alexandra Elbakyan, por su trabajo para eliminar barreras de acceso al conocimiento científico.

A la Comisión Académica de Posgrado de la Universidad de la República, por el apoyo económico durante parte de mi doctorado.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República, por la financiación de los proyectos que formaron parte de este trabajo.

A Elliana, mi compañera y principal apoyo en todo este proceso. Y a Santiago, que es lo más importante en esta vida y me dio la fuerza para terminar esta etapa.

# ÍNDICE

<b>Índice</b> .....	<b>2</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>5</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>6</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>9</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>11</b>
<b>Esclerosis Lateral Amiotrófica</b> .....	<b>11</b>
<b>ELA y Células de la Glía</b> .....	<b>13</b>
<b>ELA y mitocondria</b> .....	<b>16</b>
<b>Alteraciones mitocondriales en los astrocitos</b> .....	<b>20</b>
<b>Terapias dirigidas hacia las mitocondrias en la ELA</b> .....	<b>21</b>
<b>Neurotoxicidad mediada por astrocitos y vesículas extracelulares</b> .....	<b>25</b>
Vesículas extracelulares .....	25
Exosomas y mitocondria .....	27
Exosomas y estrés oxidativo.....	27
Exosomas de astrocitos.....	28
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	<b>30</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>30</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>30</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>30</b>
<b>Capítulo 1: Ensayo de antioxidantes dirigidos a la mitocondria en ratones SOD1G93A</b> .....	<b>31</b>
<b>Introducción y racional del estudio</b> .....	<b>31</b>
<b>Estrategia experimental</b> .....	<b>33</b>
<b>Resultados principales</b> .....	<b>34</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>34</b>
<b>Publicación 1</b> .....	<b>37</b>
<b>Capítulo 2: Modulación metabólica de astrocitos como blanco para prevenir la muerte neuronal en la ELA</b> .....	<b>38</b>
<b>Introducción y racional del estudio</b> .....	<b>38</b>
<b>Estrategia experimental</b> .....	<b>39</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>39</b>
Materiales.....	39
Consideraciones éticas .....	39
Animales .....	40
Cultivos de astrocitos.....	40

Cultivos de motoneuronas.....	40
Cocultivos astrocitos - motoneuronas.....	41
Transfección de siRNA .....	41
Western blot .....	42
qPCR.....	42
Respirometría .....	43
Análisis de la morfología mitocondrial .....	44
Marcado y cuantificación de inclusiones lipídicas .....	46
Ensayos de supervivencia de motoneuronas .....	46
Estadística.....	47
<b>Resultados .....</b>	<b>47</b>
El silenciamiento del ARNm de PDK2 redujo la fosforilación de PDH en astrocitos.....	47
El silenciamiento del ARNm de PDK2 en astrocitos SOD1G93A aumentó los parámetros bioenergéticos mitocondriales .....	47
Las modificaciones bioenergéticas mitocondriales descritas se acompañaron de una modificación estructural de la red mitocondrial .....	51
El silenciamiento del ARNm de PDK2 redujo la acumulación de gotas lipídicas en astrocitos SOD1G93A .....	53
EL silenciamiento génico de PDK2 aumenta capacidad de astrocitos SOD1G93A para sostener la supervivencia de motoneuronas.....	53
El silenciamiento génico de Nrf2 anula la capacidad trófica adquirida por el silenciamiento de PDK2 en astrocitos SOD1G93A.....	56
<b>Discusión.....</b>	<b>57</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>61</b>
<b>Manuscrito capítulo 2 .....</b>	<b>63</b>
<b><i>Resultados complementarios: Efecto de la activación de Nrf2 utilizando nitrolípidos en modelos celulares y animales de ELA .....</i></b>	<b><i>64</i></b>
<b>Introducción .....</b>	<b>64</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>65</b>
Materiales.....	65
Nitrolípidos .....	65
Consideraciones éticas .....	65
Animales .....	66
Cultivos de astrocitos.....	66
Tratamiento de las células en cultivo .....	67
Transfección de siRNA .....	67
Cultivos de motoneuronas.....	67
PCR.....	68
Grupos experimentales de ratones .....	68
<b>Resultados .....</b>	<b>69</b>
El tratamiento con nitrolípidos inhibe la muerte de motoneuronas mediada por astrocitos SOD1G93A .....	69
El NO <sub>2</sub> -OA mejora el desempeño motor de los ratones SOD1G93A .....	71
<b>Conclusiones .....</b>	<b>72</b>
<b>Publicación 2 .....</b>	<b>73</b>



<b>Capítulo 3: Análisis de la fracción exosomal de astrocitos SOD1G93A.....</b>	<b>74</b>
<b>Introducción y racional del estudio.....</b>	<b>74</b>
<b>Objetivo .....</b>	<b>74</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>75</b>
Materiales.....	75
Consideraciones éticas .....	75
Animales .....	75
Cultivos de astrocitos.....	75
Cultivos de motoneuronas.....	76
Cultivos de células gliales aberrantes (AbGCs).....	77
Obtención de exomas .....	77
Tratamiento de motoneuronas y conteo .....	79
Western blot .....	79
Microscopía electrónica.....	80
Proteómica.....	80
Ensayos de supervivencia y progresión de síntomas en ratones .....	80
Estadística.....	81
<b>Resultados .....</b>	<b>81</b>
Caracterización de la fracción exosomal de astrocitos .....	81
La fracción enriquecida en exomas de astrocitos SOD1G93A reduce la supervivencia de motoneuronas No TG en cultivos .....	83
La fracción exosomal de astrocitos SOD1G93A contiene la enzima humana SOD1G93A, pero no se detectan otras proteínas vinculadas con muerte de motoneuronas.....	86
El análisis proteómico de los exomas muestra variaciones en el contenido de proteínas relevante para la función neural.....	88
Estudio del efecto de un inhibidor de la producción de exomas sobre el desarrollo de la enfermedad en un modelo animal de ELA.....	90
<b>Discusión.....</b>	<b>92</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>95</b>
<b>Conclusiones y perspectivas .....</b>	<b>96</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>98</b>
<b>Anexo 1: Otras publicaciones .....</b>	<b>121</b>
<b>Anexo 2: Figuras suplementarias.....</b>	<b>122</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Patofisiología de la ELA .....	13
Figura 2.- Modelo esquemático de la cadena de transporte de electrones, fosforilación oxidativa y producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) en la mitocondria. ....	19
Figura 3.- Efectos de la inhibición/silenciamiento de PDK sobre la actividad mitocondrial .....	24
Figura 4.- Principales características de las vesículas extracelulares.....	26
Figura 5.- Mecanismo de entrada a las células y acción del MitoQ.....	33
Figura 6.- Flujo de trabajo para el análisis de la morfología mitocondrial y clasificación de tipos de mitocondrias.....	45
Figura 7.- El tratamiento con siRNA contra PDK2 redujo la expresión del ARNm de PDK2 y la actividad PDK en astrocitos .....	49
Figura 8.- El silenciamiento de PDK2 mejora la función respiratoria mitocondrial de los astrocitos SOD1G93A .....	50
Figura 9.- Efecto del silenciamiento de PDK2 sobre la estructura de la red mitocondrial de los astrocitos SOD1G93A.....	52
Figura 10.- El silenciamiento de PDK altera la acumulación de inclusiones lipídicas de los astrocitos SOD1G93A .....	54
Figura 11.- El silenciamiento de PDK2 aumenta la capacidad de los astrocitos SOD1G93A para mantener la supervivencia de motoneuronas.....	55
Figura 12.- Nrf2 media los efectos beneficiosos sobre la supervivencia de motoneuronas del silenciamiento de PDK2 en astrocitos SOD1G93A.....	57
Figura 13.- El tratamiento de astrocitos SOD1G93A con nitrolípidos previene su actividad neurotóxica hacia motoneuronas.....	70
Figura 14.- Efecto del ácido nitro-oleico sobre el desempeño motor y supervivencia de ratones SOD1G93A .....	72
Figura 15.- Esquema del método para la obtención de fracciones enriquecidas en exosomas .....	78
Figura 16.- Caracterización de los exosomas de astrocitos .....	82
Figura 17.- Los exosomas de astrocitos neonatales SOD1G93A inducen la muerte de motoneuronas .....	84
Figura 18.- Efecto de los exosomas gliales sobre la supervivencia de motoneuronas en otros modelos de muerte neuronal.....	85
Figura 19.- Detección de la proteína SOD humana en exosomas de astrocitos SOD1G93A.....	86
Figura 20.- Detección de proteínas en exosomas por western blot .....	88
Figura 21.- Diferencias detectadas en el contenido proteico de exosomas de astrocitos no transgénicos y SOD1G93A. ....	90
Figura 22.- El tratamiento de ratones SOD1G93A con un compuesto inhibidor de la producción de exosomas no afectó su progresión de síntomas ni supervivencia.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

aA – antimicina A

AA – ácido araquidónico

AbGCs – células gliales aberrantes (*aberrant glial cells*)

Ara-C – arabinósido de citosina

ARE – elemento de respuesta antioxidante (*antioxidant response element*)

ATP – adenosín5'-trifosfato

BSA – albúmina sérica bovina

CD40L – ligando de CD40

DCA – dicloroacetato

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO – dimetilsulfóxido

Drp1 – proteína relacionada a la dinamina 1 (*dynamin-related protein 1*)

ECAR – tasa de acidificación extracelular (*extracellular acidification rate*)

ELA – Esclerosis Lateral Amiotrófica

ELAe – Esclerosis Lateral Amiotrófica esporádica

ELAf – Esclerosis Lateral Amiotrófica familiar

EROs – Especies reactivas del oxígeno

ERONs – Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

FasL – ligando de FAS

FBS – suero fetal bovino (*fetal bovine serum*)

FCCP – carbonyl cyanide p- trifluoromethoxyphenylhydrazone

FGF-1 – factor de crecimiento fibroblástico 1 (*fibroblast growth factor 1*)

FUS – *fused in sarcoma*

GDNF – factor neurotrófico derivado de células gliales (*glial cell-derived neurotrophic factor*)

GFAP – Proteína Ácida Glial Fibrilar (*glial fibrillary acidic protein*)

GS – glutamina sintasa

GSS – glutatión sintetasa

HO-1 – hemoxigenasa-1

IL-1  $\beta$  – interleuquina-1 $\beta$

Keap-1 – *Kelch-like ECH-associated protein 1*

LCN2 – Lipocalina 2

LD – Inclusiones lipídicas (*lipid droplets*)

LPS - lipopolisacárido bacteriano

MFF – factor de fisión mitocondrial (*mitochondrial fission factor*)

MME - Membrana mitocondrial externa

MMI - Membrana mitocondrial interna

NADH - nicotinamida adenina dinucleótido

NC siRNA – siRNA control negativo sin blanco en el transcriptoma

NGF – factor de crecimiento nervioso (*nerve growth factor*)

no Tg - no transgénicos

NO<sub>2</sub>-AA – ácido nitro-araquidónico

NO<sub>2</sub>-OA – ácido nitro-oleico

Nrf2 – factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

nSMase2 – esfingomielinasa neutra 2

OCR – tasa de consumo de oxígeno (*oxygen consumption rate*)

OXPHOS – fosforilación oxidativa (*oxidative phosphorylation*)

PBS – buffer fosfato salino (*phosphate-buffered saline*)

PCR – reacción en cadena de la polimerasa

PDC – complejo piruvato deshidrogenasa

PDH – piruvato deshidrogenasa

PK - piruvato deshidrogenasa quinasa (*pyruvate dehydrogenase kinase*)

RCR – índice de control respiratorio (*respiratory control ratio*)

ROCK2 – proteína quinasa asociada a Rho 2 (*Rho-associated protein kinase 2*)

S100B – proteína de unión a calcio S100 B

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

TDP-43 – *TAR DNA-binding protein 43*

TNF- $\alpha$  – factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* )

VDAC1 - canal aniónico dependiente de voltaje 1 (*voltage-dependent anion channel 1*)

## RESUMEN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad humana neurodegenerativa mortal caracterizada por la degeneración de las motoneuronas. Los mecanismos moleculares aún se desconocen y las pocas terapias disponibles tienen efectos muy modestos sobre el curso de la enfermedad. Existen numerosas evidencias de que la glía y particularmente los astrocitos participan en el desarrollo de la patología. Los astrocitos constituyen el sostén anatómico y metabólico de las neuronas en el sistema nervioso central. A diferencia de los astrocitos normales, los astrocitos obtenidos de animales transgénicos modelo de ELA que sobre-expresan la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) humana con una mutación puntual (SOD1G93A) asociada a la ELA, inducen la muerte de motoneuronas por un mecanismo aún no totalmente dilucidado. Además, los astrocitos SOD1G93A presentan función respiratoria mitocondrial reducida comparada con los astrocitos salvajes. El tratamiento con drogas que aumentan la función mitocondrial mejora su capacidad para sostener la vida neuronal en cultivo. Esto demuestra que existe una relación estrecha entre la función mitocondrial y el fenotipo neurotrófico-neurotóxico de los astrocitos.

En este trabajo de tesis de doctorado profundizamos en el estudio de la toxicidad mediada por astrocitos y la participación de la función mitocondrial en modular la capacidad astrocitaria para sostener la supervivencia neuronal y agrupamos los resultados en tres capítulos.

En el primer capítulo, estudiamos los efectos del tratamiento de ratones SOD1G93A con una preparación oral de MitoQ, un antioxidante dirigido a la mitocondria. El tratamiento estimuló la función mitocondrial y redujo la reactividad glial en la médula espinal, junto con efectos beneficiosos sobre distintos aspectos comportamentales tales como fuerza muscular e inicio de alteraciones motoras y además extendió la supervivencia de los ratones.

En el segundo capítulo, ensayamos el efecto de la modulación metabólica en astrocitos mediante el silenciamiento génico de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), tratamiento que aumentó la función respiratoria mitocondrial en astrocitos SOD1G93A. Es de resaltar que además estos astrocitos aumentaron su capacidad de sostener la supervivencia de motoneuronas. Además, demostramos la participación del factor de transcripción Nrf2 en la capacidad trófica de astrocitos.

Nuestros estudios soportan la hipótesis de que una modificación en la actividad mitocondrial en astrocitos subyace a la disminución de la actividad trófica para las motoneuronas circundantes, aportando un blanco terapéutico que puede modificar el curso de la enfermedad. Estos estudios

aclaran algunos aspectos de la patología que resultan claves para el tratamiento de una enfermedad que no tiene cura.

En el último capítulo, con el fin de indagar en los mecanismos que median la neurotoxicidad astrocitaria, analizamos la liberación de vesículas extracelulares de tipo exosomas por parte de los astrocitos. Demostramos que las preparaciones purificadas de exosomas de astrocitos SOD1G93A reducen la supervivencia de motoneuronas cosa que no ocurre en presencia de la fracción obtenida de astrocitos no transgénicos o de medios condicionados libres de exosomas. Indagamos en algunos aspectos del contenido de los exosomas de astrocitos SOD1G93A e identificamos algunas proteínas de interés para la interacción astrocito-motoneurona. Estos resultados apoyan un rol para estas vesículas en la mediación de la actividad neurotóxica de astrocitos en este modelo.

# INTRODUCCIÓN

## ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, es un trastorno neurodegenerativo grave que afecta a las motoneuronas tanto superiores (corteza motora) como inferiores (tronco cerebral y médula espinal). Los individuos afectados muestran síntomas y signos derivados de la atrofia muscular progresiva que lleva a la muerte luego de 2 a 5 años de realizado el diagnóstico, generalmente por insuficiencia ventilatoria (Brown & Al-Chalabi, 2017; Fearon et al., 2021).

Es una enfermedad poco frecuente, con una prevalencia de aproximadamente 6/100.000 habitantes en el mundo y una incidencia anual global de 1,2 a 2/100.000 habitantes (Fearon et al., 2021). Estos datos no difieren mucho en Uruguay, donde un estudio realizado en un período de 2 años (2002-2003) estimó una prevalencia e incidencia anual cada 100.000 habitantes de 2,01 y 1,42, respectivamente (Vázquez et al., 2008). Su relevancia está dada por lo dramático del cuadro clínico y la ausencia de terapias efectivas.

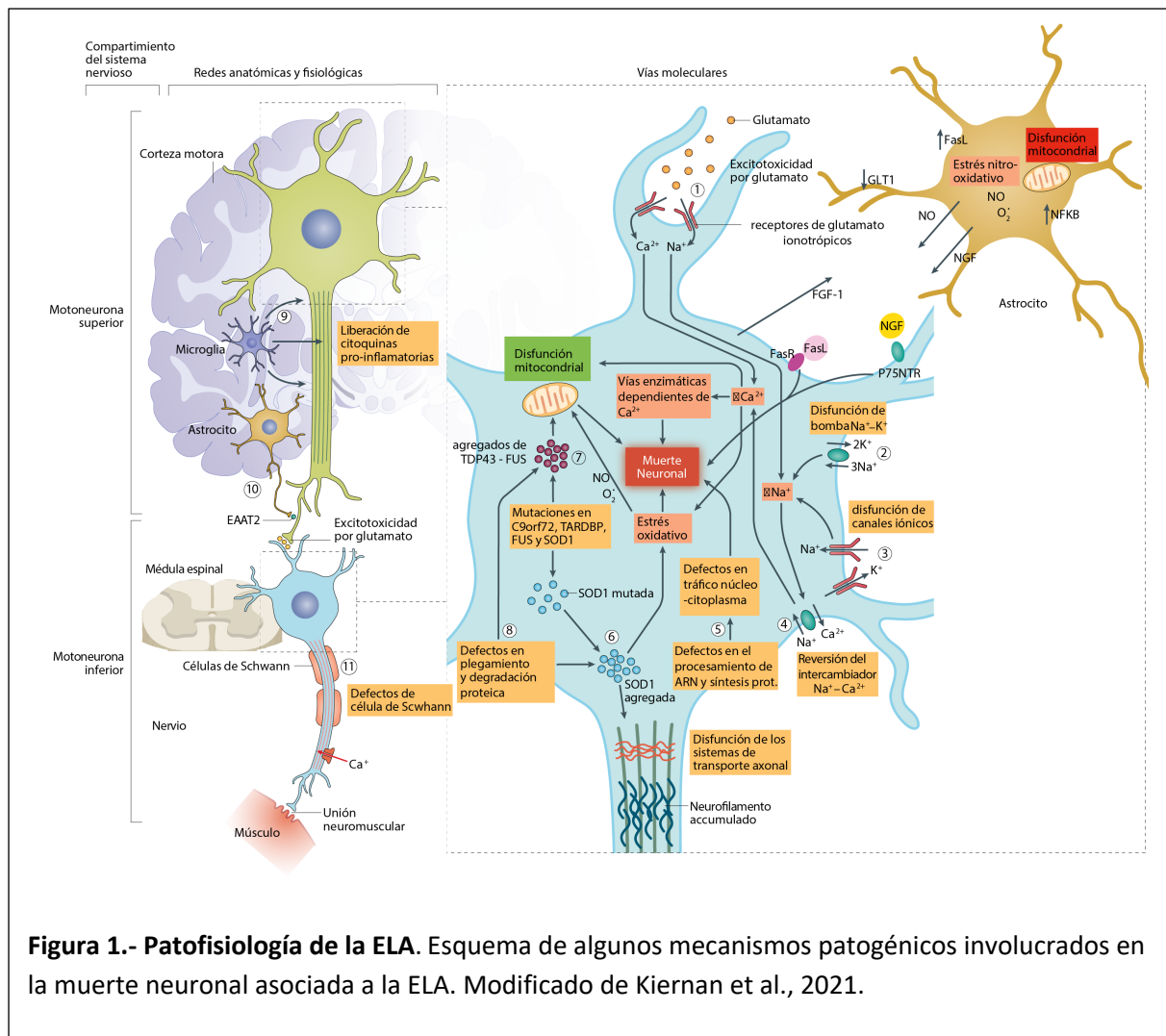
Se manifiesta en la vida adulta, generalmente en la sexta década de vida. No tiene tratamiento curativo y el desarrollo de nuevas terapéuticas se ha visto enlentecido por el poco conocimiento de los procesos biológicos que disparan la enfermedad. Hasta el momento sólo dos drogas están aprobadas para su tratamiento: riluzole (Rilutek) y edaravone (Radicava) que muestran una modesta repercusión en la calidad de vida de los individuos afectados (Kiernan et al., 2021), extendiendo la vida unos 3-6 meses en promedio. El riluzole inhibe la liberación de glutamato, lo que reduciría la excitotoxicidad mediada por glutamato en la ELA. El edaravone es un compuesto con actividad antioxidante. En este momento se encuentra aprobada en Canadá una terapia combinando fenilbutirato y ácido taurodesoxicólico (Albrioza), estrategia que busca combatir alteraciones mitocondriales y del retículo endoplásmico, pero su aprobación aún no se ha extendido a otros países (Heo, 2022).

El 95% de los casos de ELA se presentan de manera aislada y se designa como ELA esporádica (ELAe) (Al-Chalabi et al., 2010). Mientras que un 5 % de los casos se presentan con historia familiar (ELAf) pero con un comportamiento patológico indistinguible de los casos esporádicos (Fang et al., 2009; Ryan et al., 2019). En este sentido, se han identificado varios genes asociados a la ELA entre los cuales se destacan: SOD1, C9orf72, ATXN2, TARDBP, FUS, VAPB, ANG, OPTN, entre otros (Amado & Davidson, 2021). El gen de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD1) con mutaciones asociadas a la



ELA fue uno de los primeros en identificarse (Rosen et al., 1993) y su sobreexpresión en ratones o ratas (Gurney et al., 1994; Howland et al., 2002) indujo alteraciones motoras en los animales transgénicos similares a las que presentan los individuos portadores de ELA. Estos animales resultaron una herramienta importante para la investigación de los mecanismos patogénicos de la enfermedad. Se han creado numerosas cepas de ratas y ratones que expresan la SOD1 humana con distintas mutaciones asociadas a ELA y variados niveles de expresión de estas. Nuestro laboratorio cuenta con colonias de ratas y ratones que sobre-expresan la SOD1 humana con una mutación puntual que sustituye la glicina en posición 93 por alanina (SOD1G93A), una de las mutaciones más frecuentemente usadas como modelo de la enfermedad. En este modelo los síntomas motores se manifiestan alrededor de los tres meses de vida en el ratón y seis en la rata, y la etapa terminal de la patología (el animal no puede incorporarse) se alcanza aproximadamente en un período de 30-40 días. Recientemente se han desarrollado modelos animales de ELA basados en mutaciones de genes menos representadas en la ELA que la SOD1 (Philips & Rothstein, 2015), como las proteínas TDP-43 (*TAR DNA-binding protein 43*) y FUS (*fused in sarcoma*), ambas implicadas en el procesamiento de ARN. Si bien estas mutaciones parecerían implicar mecanismos en principio diferentes a los de los modelos SOD1, aún es necesario caracterizar más a fondo los mecanismos patogénicos afectados y cómo todos convergen en la muerte de motoneuronas.

La etiología de la ELA es desconocida. Sin embargo se han planteado numerosas hipótesis respecto a su patogenia (Figura 1) y que incluye mecanismos celulares tales como: la excitotoxicidad mediada por glutamato, aumento en la producción de estrés oxidativo, mal plegamiento y agregación proteica intracelular, anormalidades del citoesqueleto, autoinmunidad, alteración del soporte trófico, exposición a tóxicos ambientales y alteraciones mitocondriales, de particular interés para esta tesis (Kiernan et al., 2021). Analizar estos mecanismos en tipos celulares diferentes resulta de interés para contribuir al conocimiento de esta patología tan devastadora y contribuir al desarrollo de nuevas terapéuticas que puedan cambiar la historia natural de la enfermedad.



## ELA Y CÉLULAS DE LA GLÍA

Tradicionalmente el estudio de las enfermedades neurodegenerativas se ha centrado en la población neuronal afectada, considerándose cualquier alteración glial como un efecto secundario de las alteraciones neuronales. Sin embargo, más adelante se ha expandido notablemente nuestro conocimiento sobre la participación de células no neuronales, particularmente la glía, en la fisiología del sistema nervioso y en las enfermedades neurodegenerativas (Lago-Baldaia et al., 2020; Vahsen et al., 2021).

Las células gliales son fundamentales en la organización estructural del tejido nervioso, además de cumplir tareas esenciales de soporte trófico, metabólico y funcional, regulando el microambiente del sistema nervioso. 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; Oberheim et al.,

2012; Verkhratsky, 2010). El número de células gliales en el sistema nervioso en comparación con el número de neuronas es un tema debatido. Tradicionalmente se ha estimado que el número de glías duplica al de neuronas o incluso llega a superarlo en una relación 10:1, aunque estudios más recientes plantean que las células gliales igualan el número de neuronas en varias regiones del SNC (Allen & Lyons, 2018; Herculano-Houzel, 2014; von Bartheld et al., 2016). Las células gliales que se reconocen clásicamente en el SNC son los astrocitos, oligodendrocitos, microglía, ependimocitos, células del epitelio coroideo, y las células progenitoras de oligodendrocitos o células NG2 (Allen & Barres, 2009; Allen & Lyons, 2018; Verkhratsky et al., 2019). Las células gliales del SNC comparten en su mayoría un origen embriológico común con las neuronas, derivando del neuroectodermo, a excepción de la microglía, cuyos precursores invaden el SNC provenientes del saco vitelino en etapas tempranas del desarrollo (Allen & Barres, 2009; Nayak et al., 2014).

Los astrocitos, de particular interés para esta tesis, están presentes en todo el SNC, donde cumplen actividades esenciales para las funciones de éste, tanto en situaciones normales como patológicas (Rossi, 2015). En condiciones normales los astrocitos interactúan con las neuronas y sus sinapsis, además de otros tipos celulares como oligodendrocitos, células progenitoras de oligodendrocitos, microglía, diferentes tipos celulares perivasculares, fibroblastos meníngeos, y células inmunes circulantes (Allen & Lyons, 2018). En condiciones normales los astrocitos mantienen la homeostasis del fluido extracelular, iones y neurotransmisores, proveen metabolitos de la glucosa como sustratos energéticos para las neuronas, modulan el flujo sanguíneo local, contribuyen al drenaje del fluido intersticial, cumplen roles esenciales en la generación y el procesamiento de la información sináptica además del desarrollo y plasticidad sináptica, y muestran actividades dinámicas cruciales para circuitos neurales y comportamiento (Allen & Lyons, 2018; Rossi, 2015; Sofroniew, 2020; Sofroniew & Vinters, 2010).

En situaciones de injuria, el SNC inicia una respuesta llamada gliosis reactiva que involucra a los astrocitos y a la microglía. Los astrocitos responden al daño del sistema nervioso adoptando un “fenotipo reactivo”, caracterizado morfológicamente por hipertrofia de los núcleos y cuerpos celulares, por el desarrollo de procesos gruesos y largos con un alto contenido de GFAP (proteína ácida fibrilar glial) y aumento en la capacidad de proliferación. Además, los astrocitos reactivos aumentan la expresión de una gran variedad de genes, incluyendo proteínas del citoesqueleto, de superficie, de la matriz extracelular, proteasas, inhibidores de proteasas, citoquinas y factores de crecimiento (Liddel & Barres, 2017; Pekny & Nilsson, 2005; Sofroniew, 2020).

En la ELA se detecta una pronunciada gliosis reactiva rodeando a las motoneuronas en degeneración, tanto en la corteza como en la médula espinal y el nivel de activación astrocitaria se correlaciona con

el grado de degeneración (Barbeito et al., 2004; Phatnani & Maniatis, 2015). Al ser la activación astrocitaria un rasgo común de varias condiciones patológicas como la isquemia cerebral, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la demencia frontotemporal y la enfermedad de Huntington, ha sido considerada tradicionalmente como una respuesta inespecífica al daño neural. Sin embargo, actualmente se reconoce que los astrocitos activados cumplen un papel activo protagónico en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas (Lago-Baldaia et al., 2020; Verkhatsky et al., 2012).

Actualmente se acepta que la ELA no es una enfermedad de un único tipo celular. Estudios pioneros utilizando animales quiméricos demostraron que las células gliales que rodean a las motoneuronas determinan la supervivencia de las mismas (Clement et al., 2003) y se ha focalizado la investigación en cada uno de los tipos gliales: la microglía, oligodendrocitos y particularmente los astrocitos. En este sentido han resultado de gran utilidad experimentos de expresión selectiva o escisión génica de la SOD1 mutada en los distintos tipos celulares. Los ratones que expresan la SOD1 mutada únicamente en motoneuronas o en astrocitos no desarrollan la enfermedad (Gong et al., 2000; Pramatarova et al., 2001). La expresión de SOD1 mutada en las motoneuronas tendría un rol disparador de la enfermedad, dado que la disminución en su expresión únicamente en motoneuronas es capaz de postergar el inicio, pero no enlentecer el progreso de la patología (Boillée et al., 2006). Por otro lado, una reducción en los niveles de expresión de SOD1 mutada en microglía o en astrocitos es capaz de enlentecer la progresión de la enfermedad sin afectar el inicio de síntomas (Boillée et al., 2006; Yamanaka et al., 2008). Los astrocitos y la microglía activada en respuesta a la degeneración de neuronas tendrían un rol determinante de la progresión de la enfermedad, amplificando y profundizando el daño.

Recientemente se han reportado más evidencias de que los astrocitos contribuyen a la patogenia de la ELA. En primer lugar, utilizando un modelo de cocultivo que permite examinar en detalle las interacciones entre dos tipos celulares sin la influencia del resto del tejido, se ha demostrado que los astrocitos portadores de SOD1 mutadas (SOD1G93A) presentan una disminución de la capacidad para mantener la supervivencia de las motoneuronas, lo cual podría reflejar el rol de los astrocitos en la progresión de la enfermedad. Esto se demostró tanto para astrocitos derivados de modelos murinos (Díaz-Amarilla et al., 2011; Nagai et al., 2007; Vargas et al., 2006) como para derivados de células madres (Di Giorgio et al., 2007) o de fibroblastos de individuos afectados por ELA familiar o esporádica (Haidet-Phillips et al., 2011; Meyer et al., 2014).

De hecho, el aislamiento de astrocitos con un fenotipo aberrante (llamados “células AbA”, por astrocitos aberrantes, o “AbGCs” por células gliales aberrantes) a partir de cultivos primarios de médula espinal de ratas SOD1G93A sintomáticas, caracterizados por una capacidad proliferativa y

neurotóxica aún mayor que la de los astrocitos obtenidos de animales neonatales (Díaz-Amarilla et al., 2011), apoya aún más el rol de los astrocitos en la progresión de la ELA.

Por otro lado, nuestro laboratorio ha proporcionado evidencias adicionales de algunos mecanismos por los cuales los astrocitos de los modelos murinos SOD1G93A podrían contribuir a la muerte neuronal en esta enfermedad. Demostramos que existe un cambio en la comunicación motoneurona-astrocito, las motoneuronas en riesgo aumentan la liberación de FGF (Cassina et al., 2002) que estimula la liberación de factor de crecimiento nervioso (NGF) por los astrocitos el cual induce muerte de motoneuronas señalizando a través del receptor p75 (Cassina et al., 2005; Pehar et al., 2004), o aumentando la producción de las especies reactivas óxido nítrico (Vargas et al., 2006), superóxido y peroxinitrito (Cassina et al., 2008). El aumento en la capacidad antioxidante de los astrocitos restablece la capacidad de los astrocitos para mantener la supervivencia de motoneuronas en cocultivos. Diferentes estrategias para lograr este fin tales como administración de inhibidores de la óxido nítrico sintasa (NOS) o secuestradores de superóxido y peroxinitrito (Cassina et al., 2005), o mediante la activación del factor de transcripción Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (Vargas et al., 2005) fueron igualmente efectivas en sostener la supervivencia neuronal.

Es de particular interés la participación de factor de transcripción Nrf2. Éste regula la transcripción de genes que contienen el elemento de respuesta antioxidante (ARE), entre los que se incluyen enzimas antioxidantes y enzimas involucradas en la síntesis del tripéptido antioxidante glutatión (GSH). Los astrocitos constituyen la fuente neuronal de GSH, el cual puede limitar la acción deletérea del óxido nítrico en el sistema nervioso y ejercer una potente actividad neurotrófica (Dringen & Hirrlinger, 2003). La sobreexpresión de Nrf2 selectivamente en astrocitos cruzando ratones que expresan Nrf2 bajo el promotor de (GFAP-Nrf2) con ratones SOD1G93A, retrasó de manera significativa el comienzo de las alteraciones motoras y aumentó la supervivencia de los ratones (Vargas et al., 2008).

Estos resultados en conjunto demuestran que profundizar en los estudios de la participación del estrés oxidativo como en las defensas antioxidantes pueden resultar en nuevos blancos terapéuticos para prevenir la neurodegeneración en la ELA.

## ELA Y MITOCONDRIA

Desde los primeros reportes de anomalías mitocondriales en los tejidos de los individuos afectados con ELA (Atsumi, 1981; Siklós et al., 1996), las alteraciones morfológicas y funcionales mitocondriales han sido reconocidas como un tema central en la patogenia de esta enfermedad (Cozzolino et al., 2013; M. T. Islam, 2017; Obrador et al., 2021; E. F. Smith et al., 2019). Sin embargo,

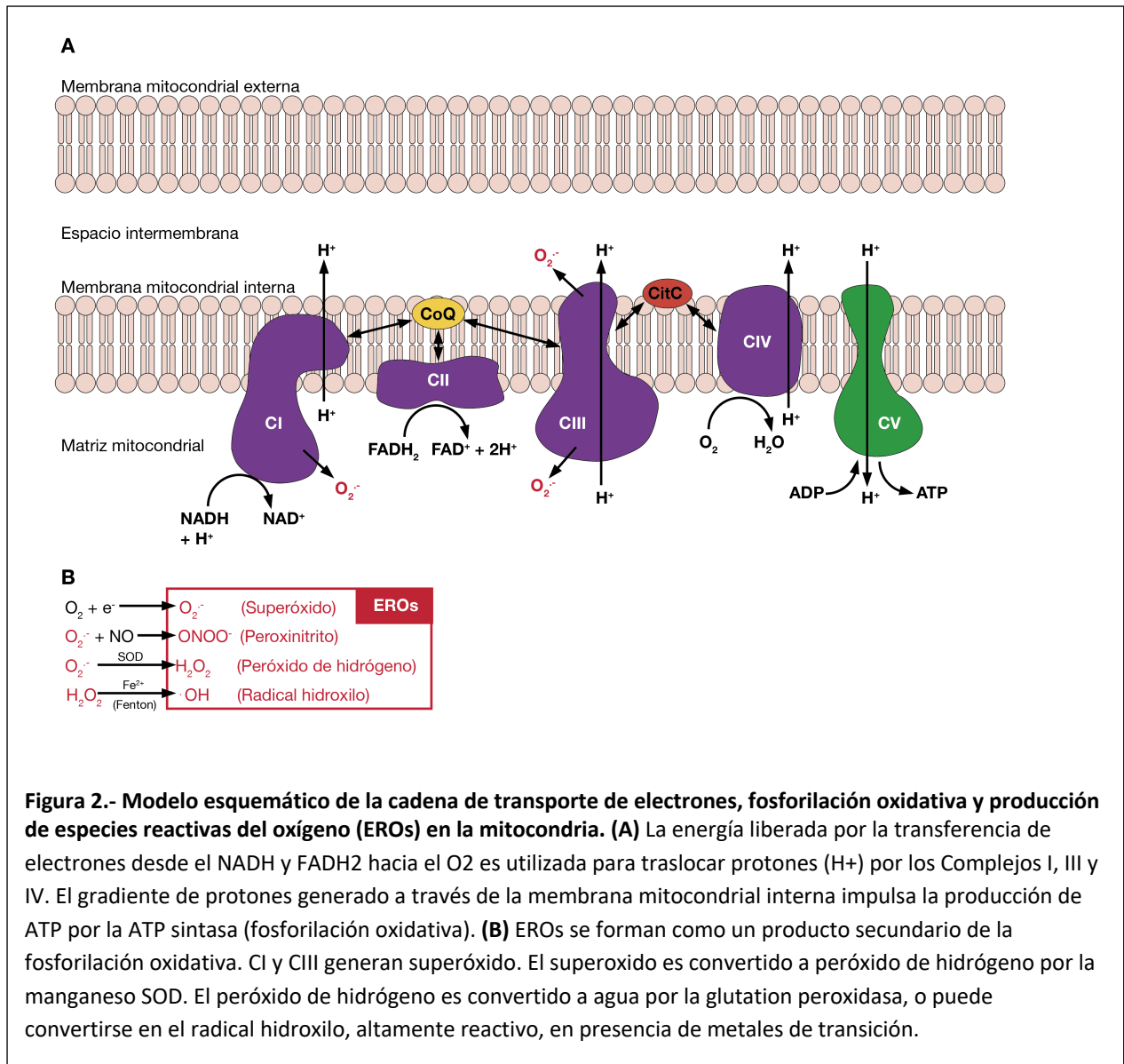
aún no se ha aclarado si estas modificaciones resultan determinantes para la aparición de la patología o son el resultado de una adaptación a la patogenicidad general.

Las mitocondrias son organelos esenciales para la vida eucariota, que regulan gran número de vías metabólicas y de señalización, incluyendo la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, síntesis de grupos hemo, fosfolípidos y otros metabolitos, almacenamiento de calcio y juegan también un rol importante en la muerte celular programada (Kawamata & Manfredi, 2010). Sin embargo, su función principal está relacionada con el metabolismo energético celular, por eso se señalan como la “central energética celular”, debido a que allí se genera la mayor parte del adenosín tri-fosfato (ATP) requerido para los procesos celulares (Alberts et al., 2017). La membrana interna mitocondrial es el sitio donde se localizan los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria: complejo I (NADH deshidrogenasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejo III (citocromo b y c1), complejo IV (citocromo oxidasa) y complejo V (la ATP sintasa). Desde el complejo I y II hasta el complejo IV se produce el transporte de electrones cedidos por las coenzimas de oxidorreducción (NADH y FADH<sub>2</sub>) donde el aceptor final es el oxígeno. El flujo de electrones en la cadena respiratoria se asocia a la salida de protones (H<sup>+</sup>), lo que provoca un potencial de membrana mitocondrial negativo ( $m\Delta\psi$ ). La ATP sintasa utiliza la energía almacenada en el  $m\Delta\psi$  para sintetizar ATP proceso que recibe el nombre de fosforilación oxidativa (OXPHOS); de esta forma el  $m\Delta\psi$  refleja la actividad de la cadena de transporte de electrones y la función mitocondrial (Alberts et al., 2017) (Figura 2). El flujo de electrones en la cadena de transporte también se asocia a la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs). De esta manera las mitocondrias constituyen un sitio principal de producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ERONS) y por lo tanto una de las principales fuentes de estrés oxidativo en las células (Radi, Cassina, Hodara, et al., 2002; J.-X. Xu, 2004). El estrés oxidativo resultante puede dañar al ADN o a las proteínas mitocondriales lo cual altera la función bioenergética de las mitocondrias y favorece la agregación de las proteínas alteradas (Radi, Cassina, & Hodara, 2002).

Desde el punto de vista estructural, las mitocondrias consisten en un gran espectro de pequeñas formaciones esféricas u ovaladas, túbulos cortos a túbulos alargados y redes reticulares dependiendo del tipo celular. La longitud de cada mitocondria puede variar entre 500 nm y más de 10  $\mu$ m, mientras que el diámetro promedio ronda los 500 nm (Detmer & Chan, 2007). La microscopía electrónica ha realizado importantes contribuciones para conocer el detalle de la ultraestructura mitocondrial describiéndolas como organelos limitados por una membrana mitocondrial externa (MME) y una membrana mitocondrial interna (MMI) plegada en múltiples crestas de diversa forma dependiendo del tipo celular. El espacio entre ambas membranas se denomina espacio intermembranoso y la región englobada por la MMI, matriz mitocondrial. Dado que una mitocondria individual puede fusionarse o

fisionarse de la red mitocondrial en respuesta a varios estímulos (Westrate et al., 2014), la masa y morfología de la red mitocondrial varían según el tipo celular y están asociadas al estado metabólico de la célula (Rambold & Pearce, 2018; Willems et al., 2015). Los procesos continuos y opuestos de fusión y fisión mitocondrial se denominan dinámica mitocondrial. La dinámica mitocondrial está regulada por varias proteínas, incluidas algunas GTPasas altamente conservadas desde el punto de vista evolutivo. La proteína GTPasa1 relacionada con la dinamina (Drp1) y los receptores de la membrana externa mitocondrial, incluido el factor de fisión mitocondrial (Mff), la proteína de fisión mitocondrial 1 (Fis1) y las proteínas de dinámica mitocondrial de 51 y 49 kDa, respectivamente (MiD51 y MiD49), controlan la fisión mitocondrial (Losón et al., 2013). Mientras que la fusión mitocondrial está mediada por la proteína de atrofia óptica 1 (Opa1) ubicada en la membrana externa mitocondrial y la mitofusina 1/2 (Mfn1/2) ubicada en la membrana interna (Adebayo et al., 2021). Las células con alta actividad respiratoria presentan mitocondrias que forman filamentos largos y amplias redes interconectadas, mientras que aquellas células quiescentes y con baja actividad respiratoria exhiben mitocondrias fragmentadas de tipo esférico granular o túbulos cortos (Galloway et al., 2012a; Willems et al., 2015). El análisis morfológico de la red mitocondrial surge entonces como una estrategia complementaria para establecer el estado metabólico celular.

En las mitocondrias de individuos afectados por ELA se han detectado anomalías morfológicas, ultraestructurales y funcionales (E. F. Smith et al., 2019). Se han descrito mitocondrias anormales agregadas en el músculo estriado esquelético, en las motoneuronas lumbares y en las terminales nerviosas motoras (Manfredi & Xu, 2005). Alteraciones similares también han sido reportadas en modelos animales de la ELA. Los ratones que expresan formas mutadas de TDP-43 o FUS asociadas a ELA presentan mitocondrias fragmentadas y vacuoladas. Lo mismo se observó en el modelo más utilizado para el estudio de la ELA, los ratones transgénicos portadores de formas mutadas de la SOD1 humana (E. F. Smith et al., 2019). La sobreexpresión de SOD1G93A hace que las células presenten alteraciones mitocondriales incluso antes de manifestar síntomas motores (Wong et al., 1995). Además, la actividad respiratoria y la síntesis de ATP de mitocondrias obtenidas a partir de la médula espinal de los ratones SOD1G93A se encuentra francamente disminuida (Cassina et al., 2008; Mattiazzi et al., 2002).



La SOD1 es una enzima antioxidante de amplia distribución en el organismo. Es un homodímero con una bien caracterizada actividad antioxidante, transformando los aniones superóxido altamente reactivos en peróxido de hidrógeno (Kabashi et al., 2007). Durante mucho tiempo se pensó que su localización era exclusivamente citosólica, pero se ha mostrado que también puede encontrarse en otras localizaciones, como el núcleo, retículo endoplasmático y particularmente en la mitocondria, principalmente en el espacio intermembrana pero también a nivel de la matriz mitocondrial (Kawamata & Manfredi, 2010). Las formas mutadas de la SOD1 que se asocian a la ELA también pueden encontrarse en las mitocondrias, tanto en el espacio intermembranoso como adheridas al lado citosólico o incluso en la matriz mitocondrial (Igoudjil et al., 2011; Vande Velde et al., 2008; Vijayvergiya, 2005). Además, se ha sugerido que la SOD1G93A puede alterar la asociación del



citocromo c con la membrana mitocondrial interna facilitando la apoptosis (Vijayvergiya, 2005) o que puede agregarse luego de ser dañada por ERONs (Deng et al., 2006). Inclusive, la expresión de la enzima mutada exclusivamente en la mitocondria demostró ser suficiente para la inducir disfunción mitocondrial (Magrane et al., 2009). Sin embargo, no está claro el mecanismo por el cual la presencia de la SOD1 mutada a nivel mitocondrial determina una disminución de la actividad mitocondrial o si esta disfunción puede ser revertida y afectar el desarrollo de la patología.

## ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN LOS ASTROCITOS

La disminución de la respiración mitocondrial constatada en los modelos animales de ELA ha sido detectada en preparaciones de médula espinal entera sin distinguir entre tipos celulares (C. Jung et al., 2002; Mattiazzi et al., 2002). Sin embargo, existen datos de que ocurre tanto en las neuronas (Menzies et al., 2002) como en las glías (Cassina et al., 2008; Martínez-Palma et al., 2019). La sobreexpresión de SOD1G93A en una línea celular de motoneuronas reproduce la morfología y la respiración mitocondrial anormal al inhibir componentes específicos de la cadena de transporte mitocondrial y determinando una mayor muerte celular por inhibición de la glucólisis anaerobia (Menzies et al., 2002). Esto sugiere que la expresión de la SOD1G93A induce un cambio a un metabolismo anaeróbico para mantener la producción de ATP. Una consecuencia potencial de la disfunción mitocondrial en la ELA entonces es la alteración del metabolismo energético. Tales observaciones adquieren relevancia para comprender el impacto de la expresión de la SOD1G93A en los astrocitos, que a diferencia de las neuronas son capaces de cambiar de un metabolismo aeróbico a uno anaeróbico en respuesta a la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial por el óxido nítrico (Bolaños, 2016), presentando así un metabolismo altamente adaptable.

Es importante destacar que la inhibición selectiva de la actividad mitocondrial en astrocitos no transgénicos (no Tg) determina una disminución de su capacidad trófica para motoneuronas en cocultivos (Cassina et al., 2008), es decir que una correcta actividad respiratoria mitocondrial en astrocitos es necesaria para mantener la supervivencia de motoneuronas o evitar la inducción de su muerte. Por otra parte, los astrocitos que expresan la mutación SOD1G93A presentan una actividad respiratoria mitocondrial reducida, con menor capacidad de síntesis de ATP y producen mayores niveles de ERONs tales como óxido nítrico, superóxido y peroxinitrito. Además, se detecta daño nitrooxidativo en proteínas mitocondriales lo cual apoya el aumento en la producción de especies reactivas. Estas alteraciones en la función mitocondrial de los astrocitos están asociadas a cambios fenotípicos que determinan una reducción en la supervivencia de motoneuronas en cocultivo, y pueden ser revertidas con antioxidantes dirigidos a la mitocondria (Cassina et al., 2008). Por lo tanto,

resulta de interés determinar el papel que juega la actividad mitocondrial de los astrocitos en la progresión de la enfermedad.

## TERAPIAS DIRIGIDAS HACIA LAS MITOCONDRIAS EN LA ELA

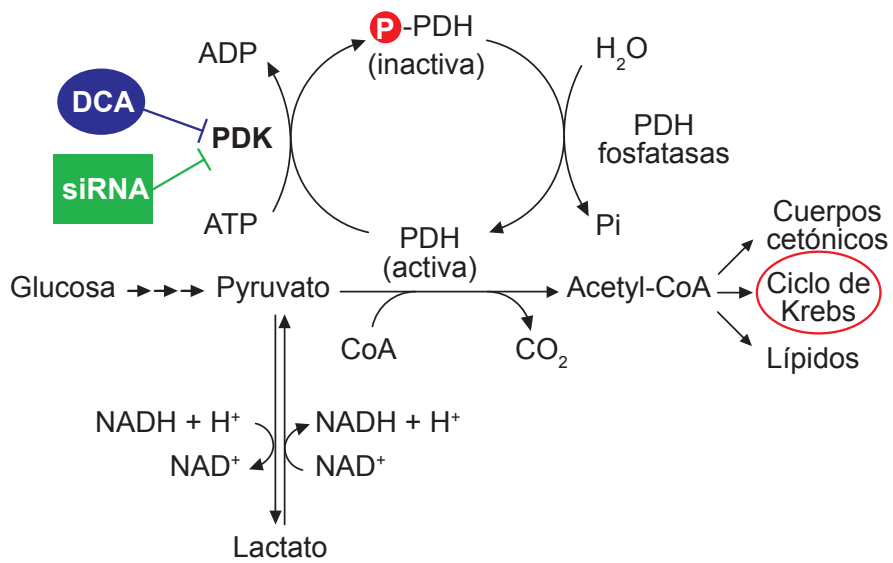
Dada la cantidad de evidencia sobre alteraciones mitocondriales y metabólicas en la ELA, no es sorprendente que se hayan probado varios tratamientos que apuntan a mejorar el estado de las mitocondrias como estrategia para mejorar la calidad de vida de pacientes y extender su vida (Tefera & Borges, 2017). Una aproximación utilizada por varios grupos de investigación es la de proveer a las células de fuentes de energía adicional para cubrir el déficit energético consecuencia de las alteraciones mitocondriales. Un ejemplo es la Triheptanoin, un triglicérido de cadena media, que sirve como combustible alternativo y también puede estimular el metabolismo de otras fuentes de energía al ayudar a suplementar metabolitos del ciclo de Krebs, ya sea por  $\beta$ -oxidación generando Acetil-CoA y propionil-CoA, o formando oxalacetato, todo lo cual contribuye a la fosforilación oxidativa. El tratamiento de ratones SOD1G93A con Triheptanoin desde P35 a P70 previno la disminución de la actividad de enzimas mitocondriales como la succinato deshidrogenasa, retrasó la muerte de motoneuronas en la médula espinal y retrasó el inicio de síntomas motores (Tefera et al., 2016). Otra aproximación metabólica y mitocondrial probada en la ELA es el protocolo Deanna, que consiste en una combinación de suplementos nutricionales. Los principales constituyentes son alfa cetoglutarato (que puede ser incorporado al ciclo de Krebs), arginina, NADH, GABA, glutatión y ubiquinol, entre otros. Si bien existen sólo reportes anecdóticos de sus efectos beneficiosos en pacientes (The ALSUntangled Group, 2013), ensayos en ratones SOD1G93A administrando la combinación de sus principales componentes retrasó los síntomas motores y extendió la vida de los ratones (Ari et al., 2014). La administración de piruvato con el objetivo de mantener la actividad mitocondrial es otra aproximación testeada en modelos de ELA, con resultados variables. El piruvato es un metabolito que puede alimentar el ciclo de Krebs luego de su conversión a Acetil-CoA en la mitocondria. En un estudio, la administración de piruvato a ratones SOD1G93A retrasó sus síntomas motores, con mejor desempeño en la prueba de rotarod y una prolongación de la vida de los animales (Park et al., 2007), aunque en otro trabajo en el mismo modelo pero con una dosis mayor no mostró ningún efecto (Esposito et al., 2007). La alimentación de ratones SOD1G86R con creatina, compuesto que estabiliza las membranas mitocondriales previniendo la apertura del poro de transición mitocondrial, aumentó la supervivencia en un 20% (Klivenyi et al., 1999) y disminuyó la depleción de ATP en el tejido nervioso (Browne et al., 2006), sin embargo los ensayos clínicos en pacientes resultaron negativos (Jan Groeneveld et al., 2003; Rosenfeld et al., 2008; Shefner et al., 2004). Otra estrategia farmacológica ha

consistido en la inhibición de la liberación de citocromo c de la mitocondria utilizando minociclina o de la apertura del poro de transición mediante ciclosporina A o un compuesto experimental llamado olesoxime, ambos fenómenos que determinan apoptosis. Estos tratamientos retardan el comienzo de los síntomas y aumentan la supervivencia de ratones transgénicos para la ELA (Bordet et al., 2007; Kirkinezos et al., 2004; S. Zhu et al., 2002). Sin embargo, no mostraron efectos beneficiosos en ensayos clínicos (Lenglet et al., 2014) e incluso la minociclina mostró efectos perjudiciales en la ELA humana (Gordon et al., 2007). El tratamiento con acetil-L-carnitina, que facilitaría el transporte de ácidos grasos a través de las membranas mitocondriales y proporciona Acetil-CoA a la mitocondria, estimulando la producción oxidativa de energía en el sistema nervioso, mostró efectos prometedores en un ensayo clínico piloto (Beghi et al., 2013), pero se necesitan estudios con un mayor número de pacientes. Otro compuesto ensayado en la ELA que tiene como blanco la mitocondria es el Dexpramipexole, que aumenta la producción de ATP mejorando la eficiencia de la fosforilación oxidativa y reduciendo el daño oxidativo de la mitocondria. Su prueba en ratones SOD1G93A condujo a preservar la función motora y extender la vida de los animales (Danzeisen et al., 2006), y en ensayos clínicos fase II redujo el declive funcional (Cudkowicz et al., 2011). Sin embargo, en ensayos clínicos fase III no mostró efectos positivos sobre los síntomas de pacientes con ELA (Cudkowicz et al., 2013).

Por otro lado, algunos antioxidantes que protegen indirectamente a la mitocondria del daño oxidativo han demostrado ser útiles en aminorar la progresión de los síntomas en modelos animales de ELA, tal es el caso del DMPO, (R. Liu et al., 2002), las metaloporfirinas (Wu et al., 2003), o la coenzima-Q (Matthews et al., 1998). Aunque este último no logró repetir sus efectos promisorios en los ensayos clínicos (Kaufmann et al., 2009). Una estrategia interesante es el tratamiento con compuestos antioxidantes diseñados para acumularse preferencialmente en las mitocondrias, el principal sitio de producción y efecto de EROs. De esa manera se podría optimizar su efecto antioxidante sobre las mitocondrias. El tratamiento de astrocitos SOD1G93A con los compuestos Mito-Q y Mito-CP (Dhanasekaran et al., 2005; Kelso et al., 2001) restableció la función mitocondrial, redujo los marcadores de estrés oxidativo y restituyó la actividad trófica para motoneuronas (Cassina et al., 2008). Sin embargo, ninguna de estas estrategias ha sido aplicada aún al tratamiento de la ELA humana.

Teniendo en cuenta la disfunción mitocondrial observada en la ELA y los datos de que una estrategia terapéutica promisoriosa podría ser la estimulación de la actividad mitocondrial a través de la facilitación del aporte de sustratos a la cadena respiratoria, hace unos años ensayamos la eficacia del organohaluro dicloroacetato (DCA) en modelos de ELA (Miquel et al., 2012). El metabolismo de la glucosa puede terminar con la glucólisis en el citosol (convirtiendo piruvato a lactato) o continuar con

la oxidación del piruvato en la mitocondria. Esto depende del control del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDC: el complejo; PDH: la enzima piruvato deshidrogenasa), localizado en la matriz mitocondrial, que media la formación de acetil-CoA a partir de piruvato. El acetil-coenzima A es sustrato para el ciclo de Krebs, el cual alimenta la cadena de transporte de electrones responsable de la síntesis de ATP y el consumo de oxígeno. La actividad de la PDH es inhibida por fosforilación por la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK). El DCA es un modulador metabólico que ha sido utilizado en humanos por décadas para el tratamiento de la acidosis láctica y enfermedades mitocondriales hereditarias (Stacpoole et al., 2008). La administración de DCA *in vivo* estimula la actividad PDH en el cerebro (Abemayor et al., 1984), lo que indica que puede cruzar la barrera hematoencefálica. El DCA es un inhibidor de PDK muy bien caracterizado (Knoechel et al., 2006). La inhibición de PDK mediada por el DCA provoca que la mayor parte de la PDH se mantenga en su forma activa, dirigiendo el metabolismo del piruvato hacia la oxidación final a CO<sub>2</sub> en la mitocondria (Figura 3), estimulando así la actividad mitocondrial. Otro mecanismo por el cual el DCA podría favorecer la actividad de la PDH es al disminuir la degradación de la subunidad E1 $\alpha$  del complejo. Se ha planteado que cambios en la fosforilación de la subunidad E1 $\alpha$  podrían afectar su susceptibilidad a las proteasas, lo que conduciría a un incremento en la concentración total de la enzima (Morten et al., 1998). El DCA revierte la remodelación metabólica que ocurre en varias líneas celulares tumorales sin afectar las células normales, induciendo apoptosis y disminución de la proliferación celular, determinando una reducción tumoral (Bonnet et al., 2007). Esta elevada tasa de proliferación observada en las células tumorales está asociada a un metabolismo glucolítico y fermentación láctica citosólica en lugar de la oxidación mitocondrial del piruvato incluso en condiciones aerobias, fenómeno que se denominó “efecto Warburg” o glucólisis aerobia (Warburg et al., 1927). Los astrocitos SOD1G93A comparten con las células tumorales alteraciones en la función respiratoria mitocondrial (Cassina et al., 2008) y una proliferación aumentada (Gandelman et al., 2010), lo que nos hizo pensar que la estrategia de inhibir la actividad PDK podría también tener efectos beneficiosos contra el fenotipo neurotóxico de los astrocitos en la ELA.



**Figura 3.- Efectos de la inhibición/silenciamiento de PDK sobre la actividad mitocondrial.** La disminución de la actividad PDK mantiene al complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) en su estado no fosforilado, catalíticamente activo, estimulando en forma preferencial que el destino del piruvato sea la fosforilación oxidativa en lugar de la fermentación láctica.

En el sistema nervioso central (SNC), la fracción de la PDH total que se encuentra en la forma fosforilada, inactiva, es usualmente mayor en la astrogliá que en las neuronas, situación que favorece la exportación de lactato desde los astrocitos hacia las neuronas, lo cual los hace un blanco ideal de tratamientos que inhiban la actividad PDK (Itoh et al., 2003). Durante mi trabajo de maestría empleamos el tratamiento con DCA sobre astrocitos en cultivo y luego en animales SOD1G93A. El tratamiento con DCA a astrocitos SOD1G93A estimuló la respiración mitocondrial y aumentó su capacidad para sostener la supervivencia de motoneuronas en cocultivos. Asimismo, la administración crónica de DCA a ratones SOD1G93A además de también estimular la respiración mitocondrial en la médula espinal, mejoró la fuerza de agarre de los miembros posteriores y aumentó la sobrevivencia de los ratones (Miquel et al., 2012). Estos hallazgos nos permitieron afirmar que la disfunción mitocondrial registrada en modelos de ELA no parece deberse a un daño irreversible del organelo, sino que resulta una adaptación a las modificaciones patológicas del entorno. Es por eso que en nuestra reciente revisión hemos propuesto la idea de reprogramación metabólica mitocondrial como blanco potencial para modificar el curso natural de la enfermedad (Cassina et al., 2021). Más allá de sus efectos beneficiosos en ciertas situaciones, el tratamiento con DCA tiene potenciales efectos adversos que limitan su aplicación. El principal es una neuropatía periférica sensoriomotora reversible (Stacpoole et al., 2019), atribuida a que la estimulación mitocondrial en las células de Schwann conduce a una elevada producción de EROs. Considerando su aplicación para el tratamiento de una

enfermedad neurodegenerativa, la generación de neuropatía periférica ha frenado la aplicación del DCA en la clínica. Sería de gran valor encontrar estrategias que permitan la estimulación de la mitocondria en los tipos celulares adecuados sin alterar el resto del organismo.

### NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR ASTROCITOS Y VESÍCULAS EXTRACELULARES

Los astrocitos que expresan SOD1G93A y otras mutaciones vinculadas a ELA inducen la muerte de motoneuronas en cultivo. Esto se ha descrito tanto en células de modelos murinos como en células aisladas de individuos afectados por ELAf o ELAe (Di Giorgio et al., 2007; Haidet-Phillips et al., 2011; Nagai et al., 2007; Vargas et al., 2006). Es interesante recalcar como ya fue mencionado que los astrocitos salvajes/normales estimulados con LPS o FGF o inhibidores de la OXPHOS también reducen su capacidad de sostener la sobrevivencia de motoneuronas (Cassina et al., 2005, 2008). La capacidad neurotóxica está presente en los medios condicionados de astrocitos, sin embargo a pesar de los múltiples reportes aún no se ha establecido claramente el mecanismo por el cual los astrocitos inducen la muerte de motoneuronas (Van Harten et al., 2021). Existe la posibilidad que de este proceso participen mecanismos más complejos que la vía secretoria clásica, como la liberación de factores a través de vesículas extracelulares.

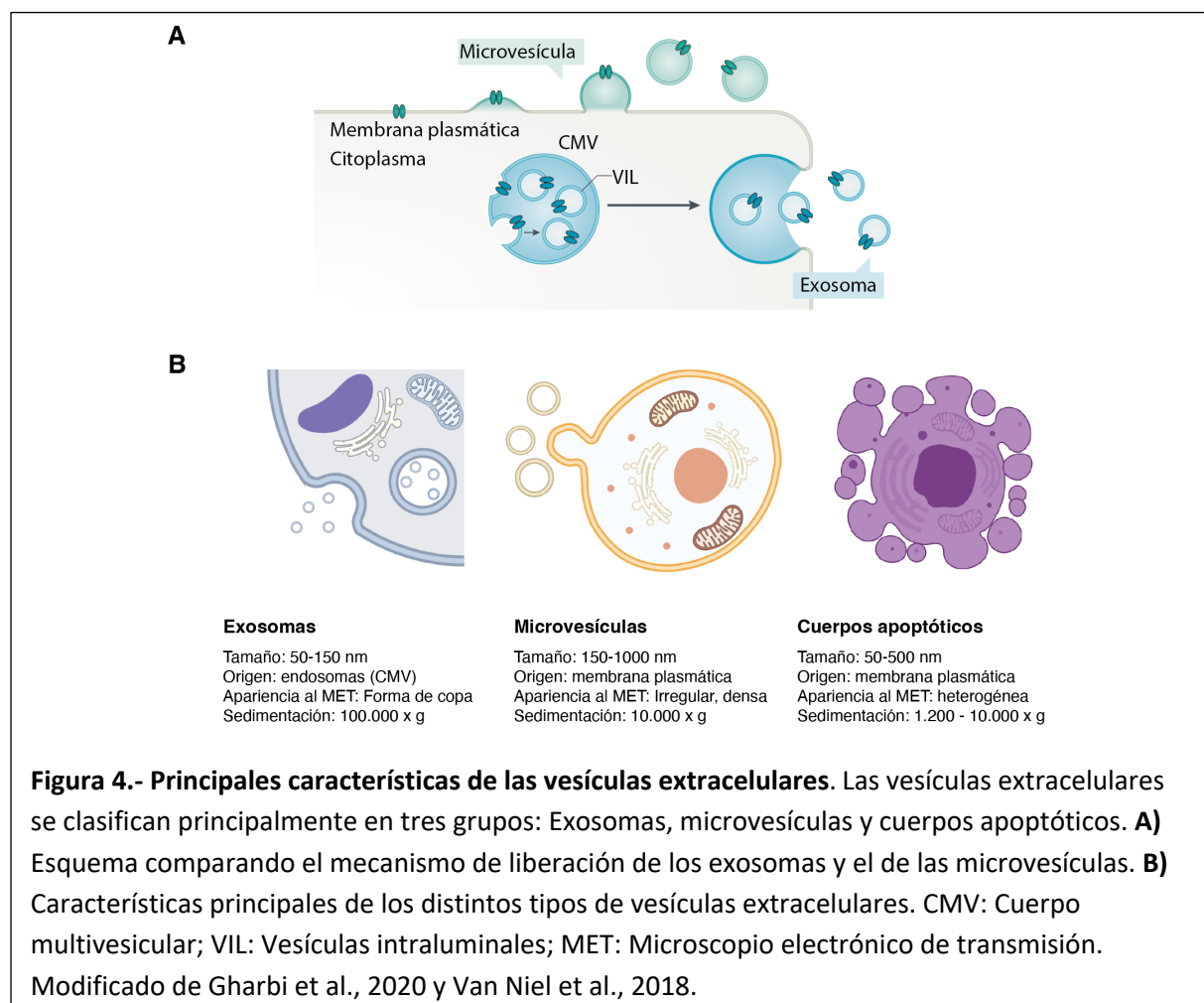
### *VESÍCULAS EXTRACELULARES*

El funcionamiento, desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso requiere de una intensa comunicación entre las células de la glía y las neuronas. Tradicionalmente el estudio de la comunicación intercelular se ha basado en mecanismos como el contacto directo célula-célula (por interacciones receptor-ligando, mediadores químicos o eléctricos), o la comunicación a mayores distancias mediada por moléculas solubles (liberadas por mecanismos como la exocitosis y actuando sobre receptores en la membrana plasmática de la célula blanco). Mas adelante ha crecido el interés en un mecanismo de comunicación intercelular de descubrimiento más reciente, basado en la liberación de vesículas extracelulares (Raposo & Stoorvogel, 2013). Las vesículas extracelulares tienen el potencial de transferir biomoléculas entre las células en forma local o a través de largas distancias.

Dentro de las vesículas extracelulares se han descrito a las microvesículas (MVs), a los exosomas y a los cuerpos apoptóticos (van Niel et al., 2018). La liberación de los cuerpos apoptóticos sucede en células apoptóticas, mientras que la liberación de microvesículas y exosomas ocurre en células perfectamente sanas. Las microvesículas son originadas por gemación directa a partir de la membrana plasmática y tienen un tamaño heterogéneo de hasta aproximadamente 1000 nm de diámetro. Los exosomas se corresponden con las vesículas intraluminales (VIL) de los cuerpos multivesiculares

(CMV) de la vía endosomal. Al fusionarse los CMV con la membrana plasmática, las VIL son liberadas al espacio extracelular formando los exosomas, vesículas extracelulares con un tamaño de entre 50 y 150 nm de diámetro (van Niel et al., 2018). Las VIL se acumulan progresivamente durante la maduración de los exosomas, formándose por gemación hacia adentro y escisión de vesículas a partir de la membrana endosomal. Durante este proceso, algunas proteínas citosólicas son incorporadas al interior de la membrana en invaginación y posteriormente encapsuladas en las VIL (Gharbi et al., 2020) (Figura 4).

Los exosomas presentan lípidos característicos, ARNs no codificantes como los microARN, y contienen una variedad de proteínas relacionadas con su biogénesis como flotillin-1, tetraspaninas, Tsg101 y Alix, integrinas, también proteínas heat shock, p-selectinas, factores de transcripción como Nrf2 y componentes específicos del tipo celular (Choi et al., 2013). La combinación de moléculas es específica según el tipo celular y los niveles de expresión dependen de las condiciones fisiológicas o patológicas de la célula (Shah et al., 2018). Se conoce menos acerca de la composición específica de las microvesículas y de su biogénesis.



## *EXOSOMAS Y MITOCONDRIA*

Recientemente se ha descrito un mecanismo que vincula la función mitocondrial con la vía de señalización exosomal. Esta nueva faceta de la biología mitocondrial implica la generación de pequeñas vesículas de transporte capaces de movilizar proteínas y lípidos mitocondriales hacia otros organelos celulares (Sugiura et al., 2014). Estas vesículas derivadas de mitocondrias (o VDMs) se generan por incorporación selectiva de cargas proteicas, las que pueden incluir únicamente proteínas de la membrana mitocondrial externa o incluir membrana externa, interna y contenido de la matriz (Neuspiel et al., 2008; Soubannier, McLelland, et al., 2012; Soubannier, Rippstein, et al., 2012). La formación de VDMs es estimulada en situaciones de stress mitocondrial y el contenido de estas VDMs no es aleatorio, sino que está finamente regulado, dependiendo de la naturaleza del stress y consistiendo preferentemente de proteínas mitocondriales oxidadas (Soubannier, Rippstein, et al., 2012). Entre los destinos celulares de las VDMs se destacan los peroxisomas, lisosomas y los cuerpos multivesiculares (Sugiura et al., 2014). Una vez en los cuerpos multivesiculares, el material mitocondrial podría pasar a formar parte de exosomas, pudiendo así participar de vías de comunicación y transporte intercelular (Crewe et al., 2021). El análisis del contenido exosomal indica que hasta el 10% de las proteínas secretadas por esta vía son mitocondriales (Burke et al., 2014; Choi et al., 2013). Esto adquiere especial relevancia no sólo por el transporte de contenido a otras células sino porque la presencia de proteínas mitocondriales en el espacio extracelular puede desencadenar respuestas inflamatorias en los tejidos (Q. Zhang et al., 2010) debido a que las proteínas codificadas por el ADN mitocondrial presentan formilmetionina al igual que las bacterianas (Wenceslau et al., 2016). Esto puede ser mediado por activación del receptor tipo Toll 9 (Q. Zhang et al., 2010) y no sólo a nivel de la superficie celular, sino que esta interacción también puede ser desencadenada dentro de los endosomas de la propia célula (Oka et al., 2012). Los resultados obtenidos en mi trabajo de maestría y en los capítulos anteriores de esta tesis muestran que la función mitocondrial es un evento clave para la capacidad de los astrocitos en mantener la supervivencia neuronal. Por lo tanto, explorar la vía de comunicación exosomal en astrocitos con actividad mitocondrial disminuida resulta especialmente relevante.

## *EXOSOMAS Y ESTRÉS OXIDATIVO*

Otro vínculo importante entre la función mitocondrial, estrés oxidativo y la vía exosomal radica en que los niveles de especies oxidantes citosólicas pueden modular directamente la formación de exosomas. La composición lipídica de los exosomas es diferente a la de otras membranas celulares, presentando



similitudes con la de las balsas lipídicas (lipid rafts) y estando enriquecida en colesterol, esfingolípidos y especialmente ceramida (Trajkovic et al., 2008). La ceramida es formada a partir de la esfingomielina por las esfingomielinasas (Clarke et al., 2006). La formación de exosomas depende de la presencia de ceramida, y en particular de la actividad de la esfingomielinasa neutra 2 (nSMase2) (Trajkovic et al., 2008). La actividad de la nSMase2 es modulada por la presencia de especies oxidantes en el citosol. En particular, el estrés oxidativo estimula la actividad de la nSMase2, aumentando los niveles de ceramida, efecto que se previene con GSH (Levy et al., 2006; B. Liu et al., 1998). De esta forma, existe la posibilidad de que los efectos beneficiosos del tratamiento de astrocitos SOD1G93A con antioxidantes que nuestro grupo ha demostrado previamente puedan estar mediados por una inhibición de la liberación de exosomas. Resulta de interés explorar esta posibilidad, especialmente teniendo en cuenta que los niveles de esfingomielina, ceramidas y colesterol se encuentran elevados en la médula espinal de pacientes de ELA y ratones SOD1G93A pre y post sintomáticos (Cutler et al., 2002). Además, numerosos factores que inducen la reactividad glial también son inductores de la actividad de nSMase2 como interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Kolesnick & Golde, 1994), LPS (Won et al., 2003), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Alessenko et al., 2005; Kolesnick & Golde, 1994),  $\beta$ -amiloide (G. Wang et al., 2012) y ATP (Garcia-Marcos et al., 2006).

### *EXOSOMAS DE ASTROCITOS*

Los astrocitos son células polifuncionales, estando involucrados en múltiples procesos, ya sea en condiciones fisiológicas como en las patológicas. Al igual que otras células, son capaces de liberar vesículas extracelulares, y existe evidencia de que las vesículas extracelulares de astrocitos pueden modular variados procesos biológicos (Vardjan et al., 2019). Sus acciones incluso podrían no restringirse al tejido nervioso, ya que se pueden aislar exosomas de astrocitos en plasma sanguíneo (Goetzl et al., 2016). En exosomas de astrocitos se han identificado proteínas asociadas al citoesqueleto, metabolismo energético, protección antioxidante, tráfico vesicular (Basso et al., 2013) y componentes del complemento (Goetzl et al., 2018). Los exosomas de los astrocitos contienen a la proteína de shock térmico Hsp/c70, un mecanismo que podría ser protector para neuronas (Taylor et al., 2007). También se ha encontrado la proteína synapsin-I, que le brindaría a los exosomas efecto neuroprotector e inductor del crecimiento neurítico (S. Wang et al., 2011). Algunos astrocitos liberan por esta vía factores que modulan la angiogénesis como endostatina (Hajrasouliha et al., 2013) o factores de crecimiento como FGF-2 y VEGF (Proia et al., 2008) También liberan metaloproteinasas de la matriz que median la proteólisis de la matriz extracelular, vinculado a procesos inflamatorios (Sbai et al., 2010). En los exosomas de astrocitos también se han identificado componentes mitocondriales

(Falchi et al., 2013; Guescini et al., 2010), lo que adquiere particular relevancia en condiciones de injuria al sistema nervioso. Más allá del contenido proteico, los exosomas de astrocitos también liberan micro ARNs (miRNAs), y es interesante que el contenido de miRNAs de los exosomas es distinto del de la célula entera, lo que habla de mecanismos de selección de carga (Gharbi et al., 2020).

Existen reportes que constatan alteraciones en la producción o composición de los exosomas de astrocitos en diversas situaciones patológicas (Gharbi et al., 2020). Por ejemplo, los astrocitos en el modelo de ELA SOD1G93A muestran un aumento en la liberación de exosomas y transportan la proteína humana SOD1G93A a las motoneuronas (Basso et al., 2013). Y frente a un estímulo trófico como el ATP o antiinflamatorio como IL-10 liberan vesículas con proteínas que estimulan el crecimiento dendrítico y sinaptogénesis, mientras que frente a un estímulo inflamatorio como IL-1  $\beta$  liberan vesículas con proteínas que regulan la respuesta inmunitaria y reclutamiento celular (Datta Chaudhuri et al., 2020). Estos datos proponen a la vía de señalización exosomal como un posible candidato para la modulación de la toxicidad mediada por astrocitos en la ELA.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de esta tesis de doctorado propone que la función respiratoria mitocondrial de los astrocitos afecta su capacidad para sostener la vida de motoneuronas, mecanismo que contribuye a la progresión de la muerte neuronal en la ELA. Las estrategias que estimulen la actividad respiratoria mitocondrial en astrocitos serán capaces de cambiar el fenotipo tóxico de estas células y modificar el curso de la patología. Por otro lado, los exosomas de los astrocitos contribuyen a la muerte de motoneuronas.

Proponemos evaluar distintos mecanismos de modulación de la función mitocondrial como herramienta para reducir la muerte neuronal característica de la ELA. Además, planteamos que este cambio fenotípico en los astrocitos está asociado a modificaciones en el contenido de las vesículas extracelulares.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Ensayar varias estrategias que estimulen la función respiratoria mitocondrial en astrocitos y ratones SOD1G93A y evaluar su efecto sobre la capacidad de sostener la supervivencia de motoneuronas y de los animales. Analizar la fracción exosomal de astrocitos y evaluar su efecto sobre las motoneuronas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1: Evaluar el efecto del bloqueo de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno a nivel mitocondrial en la función mitocondrial y en la progresión de la muerte neuronal en el modelo murino de ELA.

Objetivo 2: Estudiar los efectos de la modulación metabólica de la función mitocondrial en astrocitos mediante estrategias de silenciamiento génico en la capacidad de sostener la supervivencia de motoneuronas. Estudiar la participación del factor Nrf2 en este proceso y los efectos de la estimulación de esta vía en el modelo SOD1G93A.

Objetivo 3: Analizar la fracción de vesículas extracelulares astrocitarias como potencial mediador de la interacción astrocito-motoneurona. Evaluar su participación en el mantenimiento de la supervivencia de motoneuronas y avanzar en el estudio de su contenido.

# CAPÍTULO 1: ENSAYO DE ANTIOXIDANTES DIRIGIDOS A LA MITOCONDRIA EN RATONES SOD1G93A

## INTRODUCCIÓN Y RACIONAL DEL ESTUDIO

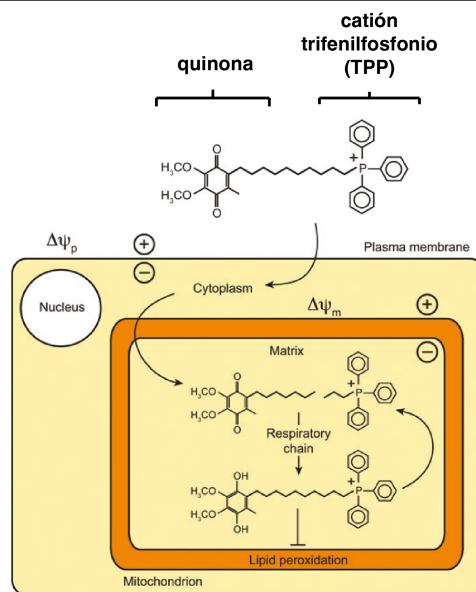
Las mitocondrias constituyen una fuente importante de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno en la mayoría de las células de mamíferos (Cadenas & Davies, 2000; Radi, 2018), incluyendo los astrocitos (Bonvento & Bolaños, 2021; Cassina et al., 2008). A su vez, estas EROs contribuyen al daño mitocondrial en varias patologías y mecanismos de señalización redox hacia el resto del entorno celular (Murphy & Hartley, 2018).

Se han descrito alteraciones en la función y morfología mitocondrial tanto en células aisladas de individuos afectados con ELA (fibroblastos o astrocitos inducidos) como de modelos murinos de ELA (E. F. Smith et al., 2019). En particular, los astrocitos neonatales purificados a partir del modelo de ratas que expresan la mutación SOD1G93A asociada a ELA humana presentan una actividad respiratoria mitocondrial reducida, con menor capacidad de síntesis de ATP en respuesta a diferentes requerimientos metabólicos (Cassina et al., 2008). Esto se acompaña de mayor producción de óxido nítrico, superóxido y peroxinitrito, detectándose daño nitrooxidativo en proteínas mitocondriales (Cassina et al., 2008), lo que podría explicar el peor desempeño de la fosforilación oxidativa. Estas alteraciones en la función mitocondrial de los astrocitos están asociadas a una reducción en la capacidad de sostener la supervivencia de motoneuronas en cocultivo (Cassina et al., 2008). Por otro lado, la inhibición farmacológica mediante inhibidores específicos de los diferentes complejos mitocondriales de la actividad mitocondrial en astrocitos no Tg determina una disminución de su capacidad trófica para motoneuronas en cocultivos (Cassina et al., 2008), lo cual sugiere que una función mitocondrial adecuada en astrocitos es necesaria para mantener la supervivencia de motoneuronas.

Estos antecedentes establecen al daño nitrooxidativo a las proteínas mitocondriales como un blanco clave para intentar desarrollar estrategias que permitan retrasar la muerte neuronal. Algunos antioxidantes que protegen indirectamente a la mitocondria del daño oxidativo han demostrado ser útiles en aminorar la progresión de los síntomas en un modelo animal de ELA (R. Liu et al., 2002; Wu et al., 2003). Una limitación importante de la terapia antioxidante es la incapacidad de aumentar las concentraciones de antioxidantes dentro de la mitocondria, el principal sitio de producción de EROs y

de daño oxidativo mediado por éstos. Una terapia efectiva podría ser la de atenuar de manera selectiva el daño oxidativo dentro de la mitocondria (Murphy & Smith, 2000). Con este fin, se han desarrollado compuestos antioxidantes diseñados para acumularse preferencialmente en las mitocondrias, como ubiquinona acoplada al catión trifenilfosfonio (Mito-Q), lo cual hace que este compuesto sea incorporado en el organelo (Dhanasekaran et al., 2005; Kelso et al., 2001) (Figura 5). Nuestro grupo ha demostrado que el tratamiento de los astrocitos SOD1G93A con estos antioxidantes mitocondriales restablece la función mitocondrial, reduce los marcadores de estrés oxidativo y restituye la actividad trófica para motoneuronas (Cassina et al., 2008). En el marco de una colaboración académica con el Dr. Rafael Radi del Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO) de la Facultad de Medicina y el Dr. Michael Murphy de la Universidad de Cambridge, Reino Unido, recibimos una preparación de MitoQ diseñada para la administración oral de animales de experimentación.

En este primer capítulo nos propusimos extender los hallazgos obtenidos en cultivo al organismo entero. Por lo tanto, indagamos los efectos de la administración de MitoQ en ratones SOD1G93A en tres aspectos: 1) función mitocondrial en la médula espinal, 2) alteraciones en la reactividad glial y nitricación de blancos proteicos, y 3) evolución de la fuerza de agarre de los miembros posteriores y supervivencia de los animales.



**Figura 5.- Mecanismo de entrada a las células y acción del MitoQ.** El MitoQ consiste en una quinona unida a un catión trifenilfosfonio (TPP) por una cadena de alquilo de 10 carbonos. El MitoQ entra al citoplasma desde el medio extracelular impulsado por el potencial de membrana plasmática ( $\Delta\psi_p$ ). Una vez dentro de la célula, el compuesto se acumula en la mitocondria impulsado por el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). Una vez adentro, el MitoQ se adsorbe a la superficie interna de la membrana mitocondrial interna, donde ejerce su acción antioxidante y su forma activa quinol es continuamente reciclada por el complejo II de la cadena respiratoria. Modificado de Smith y Murphy, 2010.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Grupos de ratones SOD1G93A y no Tg fueron tratados con una preparación oral de mito-Q o vehículo (500  $\mu\text{M}$  MitoQ o TPP) en el agua de beber administrado *ad libitum*, lo que por estudios previos significa una dosis diaria de 3,2  $\mu\text{mol}$  MitoQ/día/ratón (Rodríguez-Cuenca et al., 2010)). El inicio del tratamiento comenzó a los 90 días de edad, momento en el cual se comienzan a observar signos motores en estos animales. Se evaluó la presencia de MitoQ en el SNC, la actividad respiratoria mitocondrial y marcadores histológicos de la patología, el número de motoneuronas y los niveles de reactividad glial en la médula espinal. Además, se midió la evolución de la fuerza de los miembros posteriores y la supervivencia en los distintos grupos de ratones.

Los resultados obtenidos en esta primera etapa del trabajo de tesis de doctorado culminaron en la siguiente publicación, que se adjunta al final de este capítulo, y donde se explica en detalle la metodología y los resultados:

**Miquel, E.**, Cassina, A., Martínez-Palma, L., Souza, J. M., Bolatto, C., Rodríguez-Bottero, S., Logan, A., Smith, R.A.J., Murphy, M. P., Barbeito, L., Radi, R., 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.

## RESULTADOS PRINCIPALES

El tratamiento con MitoQ retardó el declive de la función respiratoria mitocondrial de los ratones SOD1G93A, tanto en la médula espinal como en músculo, junto a una disminución de marcadores de daño nitrooxidativo. Se retrasó la alteración en las uniones neuromusculares, así como la muerte neuronal en la médula espinal y la reactividad glial. Los ratones SOD1G93A tratados con MitoQ mantuvieron por más tiempo la fuerza de agarre en sus miembros posteriores que los controles. Finalmente, el tratamiento también fue capaz de retrasar significativamente la muerte de ratones SOD1G93A. Este trabajo aportó evidencia para apoyar la teoría de que las terapias dirigidas a la mitocondria podrían tener efectos beneficiosos en el tratamiento de la ELA.

## CONCLUSIONES

Este estudio aportó evidencia en 3 aspectos fundamentales de la patogenia de la muerte neuronal en la ELA:

- 1) Las mitocondrias de los astrocitos SOD1G93A no están irreversiblemente dañadas, sino que la función respiratoria puede volver a estimularse. Frente a la expresión de SOD1G93A los astrocitos reprogramarían su metabolismo para seguir cubriendo los requerimientos energéticos, y esa adaptación mitocondrial induciría cambios fenotípicos que determinan la pérdida del soporte trófico hacia las neuronas. Lejos estamos de la época en la que la respiración era considerada la única función mitocondrial, por lo que quizás no sea conveniente hablar de disfunción mitocondrial sino de reprogramación adaptativa (Bellissimo et al., 2022; Cassina et al., 2021) . Es clave en este concepto el hecho de que esta adaptación es sujeto de ser modulada por intervenciones externas, y la utilización de antioxidantes

dirigidos a la mitocondria es una vía por la cual podemos fomentar un cambio hacia un metabolismo más oxidativo e inducir cambios en el fenotipo astrocitario hacia uno neurotrófico. En el marco de esta tesis exploramos otras aproximaciones que hacen uso de esta flexibilidad mitocondrial. En este sentido, el tipo celular en el que enfocamos nuestro estudio es un blanco óptimo. Presentan un metabolismo mucho más flexible que el de otras células del sistema nervioso, y si bien en condiciones normales tienen un metabolismo menos oxidativo que las neuronas, igual mantienen una red mitocondrial de importante desarrollo, y a diferencia de las neuronas pueden cambiar su perfil metabólico, incrementando o disminuyendo la actividad respiratoria mitocondrial dependiendo de la situación (Bonvento & Bolaños, 2021).

- 2) La reducción de las especies reactivas a nivel mitocondrial determina un efecto modificador de la patología. Esto ocurrió tanto a nivel central, en la médula espinal, como periférico. En la médula espinal se retardó la muerte neuronal y la reactividad glial asociada, de la mano de cambios importantes en la actividad mitocondrial. Los efectos sobre las células gliales serían fundamentales para determinar la progresión de la enfermedad conduciendo a la muerte neuronal, aunque las señales que inician el proceso podrían surgir de las neuronas (Boillée et al., 2006; Yamanaka et al., 2008). El beneficio del tratamiento antioxidante a nivel central seguramente se deba a un efecto sobre múltiples tipos celulares, aunque dado que iniciamos el tratamiento en el momento clínicamente relevante del inicio de síntomas, afectando sobre todo la progresión de síntomas, probablemente la mayor parte del efecto se deba a su acción sobre las células gliales. A nivel periférico el tratamiento tuvo efectos sobre el mantenimiento estructural de las uniones neuromusculares y sobre la función muscular, retrasando el declive en la fuerza de los miembros. Esto pudo haber sido consecuencia del efecto del tratamiento sobre las neuronas, aunque no se descarta un aporte positivo de los antioxidantes sobre las células musculares y las células de Schwann asociadas a los axones a nivel periférico.
- 3) El tratamiento produjo un aumento significativo en la supervivencia de los animales superior al obtenido con la que por mucho tiempo fue la única droga aprobada para el tratamiento en ELA, y sigue siendo referencia para los ensayos clínicos de drogas: el Riluzole (Hogg et al., 2018). Vale la pena reiterar en este punto que el tratamiento utilizado en este trabajo comenzó a administrarse en la etapa en la que los ratones de este modelo comienzan a mostrar signos motores visibles (dificultad en la extensión de los miembros, alteraciones en reflejos motores), momento en el cual la degeneración neuronal ya está avanzada. Esto no es lo usual en los ensayos pre-clínicos con este modelo animal de rápido desarrollo de síntomas y muerte. Usualmente las drogas que han mostrado efectos beneficiosos se administran desde



la etapa presintomática. La obtención de efectos significativos sobre la supervivencia de los ratones habiendo iniciado el tratamiento desde el inicio de síntomas aumenta notoriamente su relevancia clínica. El hecho de que esta droga ya haya sido aprobada para su uso en humanos (Gane et al., 2010; Rossman et al., 2018; Shill et al., 2016; R. A. J. Smith & Murphy, 2010; Snow et al., 2010) permitiría su rápida evaluación en ensayos clínicos para la ELA.

## PUBLICACIÓN 1

Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. **Miquel, E.**, Cassina, A., Martínez-Palma, L., Souza, J. M., Bolatto, C., Rodríguez-Bottero, S., Logan, A., Smith, R.A.J., Murphy, M. P., Barbeito, L., Radi, R., Cassina, P. (2014). *Free Radical Biology and Medicine*, 70, 204–213.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/freeradbiomed](http://www.elsevier.com/locate/freeradbiomed)

## Original Contribution

## Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis

Ernesto Miquel<sup>a</sup>, Adriana Cassina<sup>b,c</sup>, Laura Martínez-Palma<sup>a</sup>, José M. Souza<sup>b,c</sup>, Carmen Bolatto<sup>a</sup>, Sebastián Rodríguez-Bottero<sup>a</sup>, Angela Logan<sup>d</sup>, Robin A.J. Smith<sup>e</sup>, Michael P. Murphy<sup>d</sup>, Luis Barbeito<sup>f</sup>, Rafael Radi<sup>b,c</sup>, Patricia Cassina<sup>a,c,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay<sup>c</sup> Center for Free Radical and Biomedical Research, Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay<sup>d</sup> Mitochondrial Biology Unit, Medical Research Council, Cambridge CB2 0XY, UK<sup>e</sup> Department of Chemistry, University of Otago, Dunedin 9054, New Zealand<sup>f</sup> Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 November 2013

Received in revised form

10 February 2014

Accepted 17 February 2014

Available online 26 February 2014

## Keywords:

Amyotrophic lateral sclerosis

Free radicals

Nitroxidative stress

Antioxidants

Mitochondria

MitoQ

## ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disorder characterized by motor neuron degeneration that ultimately results in progressive paralysis and death. Growing evidence indicates that mitochondrial dysfunction and oxidative stress contribute to motor neuron degeneration in ALS. To further explore the hypothesis that mitochondrial dysfunction and nitroxidative stress contribute to disease pathogenesis at the in vivo level, we assessed whether the mitochondria-targeted antioxidant [10-(4,5-dimethoxy-2-methyl-3,6-dioxo-1,4-cyclohexadien-1-yl)decyl]triphenylphosphonium methane sulfonate (MitoQ) can modify disease progression in the SOD1<sup>G93A</sup> mouse model of ALS. To do this, we administered MitoQ (500 μM) in the drinking water of SOD1<sup>G93A</sup> mice from a time when early symptoms of neurodegeneration become evident at 90 days of age until death. This regime is a clinically plausible scenario and could be more easily translated to patients as this corresponds to initiating treatment of patients after they are first diagnosed with ALS. MitoQ was detected in all tested tissues by liquid chromatography/mass spectrometry after 20 days of administration. MitoQ treatment slowed the decline of mitochondrial function, in both the spinal cord and the quadriceps muscle, as measured by high-resolution respirometry. Importantly, nitroxidative markers and pathological signs in the spinal cord of MitoQ-treated animals were markedly reduced and neuromuscular junctions were recovered associated with a significant increase in hindlimb strength. Finally, MitoQ treatment significantly prolonged the life span of SOD1<sup>G93A</sup> mice. Our results support a role for mitochondrial nitroxidative damage and dysfunction in the pathogenesis of ALS and suggest that mitochondria-targeted antioxidants may be of pharmacological use for ALS treatment.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Abbreviations:** ALS, amyotrophic lateral sclerosis; SOD1<sup>G93A</sup>, ALS-linked superoxide dismutase 1 bearing the G93A mutation; MitoQ, [10-(4,5-dimethoxy-2-methyl-3,6-dioxo-1,4-cyclohexadien-1-yl)decyl]triphenylphosphonium; TPP, triphenylphosphonium; decylITPP, decyltriphenylphosphonium cation; LC/ESI-MS/MS, liquid chromatography/electrospray ionization–mass spectrometry; MRM, multiple-reaction monitoring; d<sub>15</sub>-MitoQ, deuterated MitoQ; IS, internal standard; FCCP, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone; UCR, uncoupling control ratio; TBS, Tris-buffered saline; PBS, phosphate-buffered saline; BSA, bovine serum albumin; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HO-1, heme oxygenase-1; HNE, 4-hydroxynonenal–protein adduct; EDL, extensor digitorum longus muscle; TMR–BgTx, tetramethylrhodamine-conjugated α-bungarotoxin; non-Tg, nontransgenic; ARE, antioxidant-response element; RONS, reactive oxygen and nitrogen species

\* Corresponding author at: Universidad de la República, Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Av. General Flores 2125, Montevideo 11800, Uruguay.

E-mail address: [pcassina@fmed.edu.uy](mailto:pcassina@fmed.edu.uy) (P. Cassina).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.019>

0891-5849/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

ALS<sup>1</sup> is a fatal and devastating neurodegenerative disease that affects motor neurons, with no effective therapy available, leading to death within 3–5 years of diagnosis [1]. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in both the neurons and the surrounding glia have been implicated as a key part of the pathogenic process [2]. Reactive oxygen and nitrogen species are required for the execution of motor neuron apoptosis under various experimental conditions [3–5]. In addition, reactive astrocytes represent another source of nitric oxide and oxidants that in turn contributes to motor neuron apoptosis [5–7], suggesting that oxidative stress is involved in astrocyte-mediated motor neuron loss. As mitochondria are both the main producers and the targets of reactive species, targeting mitochondrial oxidative damage may be clinically useful in ALS.

Many antioxidant approaches have shown beneficial effects on animal models of ALS but have not been effective in human ALS

patients [8]. In particular, two molecules that stimulate mitochondrial function and prolonged survival in ALS mice, coenzyme Q10 and creatine, have been tested in phase II clinical trials and failed to demonstrate efficacy against disease progression [9,10]. These two studies, despite measuring elevated plasma levels of the compounds and assessing their ability to cross the blood–brain barrier, did not address the elevated free radical production and oxidative damage at the mitochondrial level. This is relevant because mitochondria constitute a main source of free radical production. An emerging pharmacological approach to treating mitochondrial disorders is to use mitochondria-targeted antioxidants that concentrate specifically within mitochondria in vivo to selectively decrease mitochondrial oxidative damage [11–13]. The most widely used mitochondria-targeted antioxidant to date is MitoQ, which comprises a triphenylphosphonium (TPP) functionality conjugated to an antioxidant ubiquinone moiety [14]. MitoQ is accumulated within mitochondria in vivo in response to the large mitochondrial membrane potential (negative inside) and there protects mitochondria from oxidative damage. Mitochondria are reported to be a key intracellular site for the generation of reactive species in a wide range of pathologies, and consequently MitoQ has been shown to mitigate oxidative damage in various disease animal models [15], including Alzheimer [16,17] and Parkinson [18] diseases.

The most widely used animal model of ALS is the transgenic mouse expressing a familial ALS-linked SOD1 mutation, which generally develops progressive motor neuron degeneration resembling many aspects of ALS in human patients [19,20]. Studies in SOD1 mutant mice have demonstrated “non-cell autonomous” effects of the mutations, highlighting the important role of glia in motor neuron support [21,22]. Disease onset seems to be dependent on the expression of mutant SOD1 in motor neurons, and the expression of mutant SOD1 in glial cells modulates the rate of degeneration. Interestingly, the toxicity of mutant SOD1 in cultured motor neurons [23] and astrocytes [24] was prevented by their treatment with low concentrations (nM) of MitoQ. Together, these results suggest that MitoQ is a promising candidate for ALS treatment. To further support this hypothesis we tested its ability to affect disease progression in the SOD1<sup>G93A</sup> mouse model of ALS. To do this we administered MitoQ orally to ALS mice, starting at 90 days of age, when symptoms are already evident [25]. This regime mimics the clinical situation more closely, as this corresponds to initiation of therapy after first diagnosis and would indicate if this therapy may be translatable to the clinic. We then analyzed the effects of MitoQ on nitrooxidative stress markers and key features of disease progression: survival, motor performance, neuronal loss, astrogliosis, and neuromuscular plaque decline. This approach may represent a novel mitochondria-targeted therapy for ALS.

## Materials and methods

### Materials

All reagents were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) unless otherwise specified. MitoQ as MS010 (an ~20% w/w mixture of MitoQ and  $\beta$ -cyclodextrin) and decyltriphenylphosphonium bromide (decylTPPP) were obtained from Antipodean Pharmaceuticals, Inc. Deuterated MitoQ ( $d_{15}$ -MitoQ) was synthesized as described previously [17].

### Ethics statement

Procedures using laboratory animals were in accordance with the *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*, as issued by the Council for the International Organizations

of Medical Sciences, and were approved by Institutional Animal Committee Resolution No. 66 (Exp. 071140-001465-10), Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (<http://www.chea.udelar.edu.uy>).

### Animals

Transgenic ALS mice carrying the G93A mutated human SOD1, strain B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur [19], were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). The strain was maintained by breeding hemizygous male carriers to B6SJL female hybrids. The offspring were genotyped as previously described [24]. Transgenic mice hemizygous for the SOD1 G93A transgene and non-Tg littermates were used for analysis. The mice were housed under controlled conditions with free access to food and drinking water.

### MitoQ treatment trial

Male and female transgenic mice and nontransgenic littermates were divided randomly into the following groups: (A) transgenic and nontransgenic mice that received MitoQ, (B) transgenic and nontransgenic mice that received equal concentrations of decylTPPP bromide to determine if the TPP cation had any nonspecific effects, and (C) transgenic and nontransgenic control groups that received regular drinking water. MitoQ and decylTPPP were administered as  $\beta$ -cyclodextrin complexes (Antipodean Pharmaceuticals) [26] at a 500  $\mu$ M concentration of MitoQ or decylTPPP in the drinking water supplied ad libitum, with fresh solutions made twice a week. In a previous study, this concentration yielded a daily dose of 3.2  $\mu$ mol MitoQ/day/mouse or 95–138  $\mu$ mol MitoQ/day/kg, showed no toxicity, and had no significant effect on animal body weight or food and liquid consumption [27]. Treatment was administered from 90 days of age (early symptomatic stage [19]) until death. Animals were observed weekly for onset of disease symptoms, as well as progression to death. Disease onset was scored as the first observation of abnormal gait or overt hindlimb weakness. End stage of the disease was scored as complete paralysis of both hindlimbs and the inability of the animal to right itself within 20 s of being placed on its side. When this condition was met, the mice were euthanized to limit animal suffering.

### Grip strength measurements

Motor function was tested with a grip strength meter (San Diego Instruments, San Diego, CA, USA). Tests were performed by allowing the animal to grasp the platform with both hindlimbs, followed by pulling the animal until it released the platform. The force measurement was recorded twice a week from week 6 (baseline) until death in five separate trials.

### Quantification of tissue MitoQ content

Groups of mice were treated as detailed above for 20 days and brain, heart, liver, and quadriceps muscle samples were dissected, weighed, snap-frozen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Protein concentrations were measured in tissue homogenates by Bradford assay, using BSA as protein standard. Quantification of MitoQ was performed by liquid chromatography coupled to electrospray ionization/mass spectrometry on an ion trap mass spectrometer (Qtrap2000; Applied Biosystems-MDS Sciex) [28]. Electrospray ionization of MitoQ in positive mode generated a  $m/z$  signal of 583.5 and this ion was fragmented to obtain a  $m/z$  441.3, so using multiple-reaction monitoring (MRM) mode a quantification protocol can be set following the transition 583.5/441.3 and 598.3/456.3 for  $d_{15}$ -MitoQ simultaneously [29]. MitoQ was measured

relative to a deuterated IS; 20 (for brain) and 5 pmol (for other tissues) of  $d_{15}$ -MitoQ was added to the tissue homogenate before the organic extraction. The organic extraction of MitoQ was performed as described [27]. Standard curves of tissue homogenates spiked with MitoQ and IS were linear from 0 to 100 pmol MitoQ/100 mg tissue protein, and the assay could detect 0.1 pmol MitoQ/100 mg protein.

#### Mitochondrial respiration studies

Oxygen consumption studies to evaluate mitochondrial respiratory activity were performed on spinal cord and muscle tissue using an Oxygraph 2K (Oroboros Instruments Corp.) as described previously [30], with minor modifications. Briefly, 90-day-old mice were treated with MitoQ or vehicle for 20 days ( $n = 3$  per group) and immediately after sacrifice lumbar spinal cords and quadriceps muscles were dissected. Tissue samples of 7–10 mg were immediately rinsed in respiration medium (sucrose 110 mM, Mops 60 mM, EGTA 0.5 mM, BSA 1 g/L,  $MgCl_2$  3 mM,  $KH_2PO_4$  10 mM, Hepes 20 mM, pH 7.1) and introduced into the Oroboros Oxygraph 2K chamber for high-resolution respirometry at 37 °C. After basal respiration was recorded, glutamate (10 mM)/malate (2 mM), succinate (10 mM), and ADP (1–5 mM) were added to ensure maximal availability of respiratory precursors (as the tissue typically exhibits enhanced membrane permeability due to the mechanical extraction procedures). Then, 2  $\mu$ g/ml oligomycin (ATPase inhibitor) was added followed by successive boluses of 0.5  $\mu$ M FCCP (carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone) until reaching the maximum rate of oxygen consumption. Finally, 2.5  $\mu$ M antimycin A (complex III inhibitor) was added as described [31]. The use of antimycin A assists in discriminating mitochondrial from residual (non-electron transport chain-dependent) oxygen consumption. Uncoupling control ratio (UCR) was calculated as  $UCR = (\text{maximum uncoupled flux (FCCP)} - \text{antimycin A-inhibited flux}) / (\text{routine respiration} - \text{antimycin A-inhibited flux})$  of tissue respiring. The rate of oxygen consumption was calculated by means of the equipment software (DatLab) and expressed as  $O_2$  flux per mass ( $\text{pmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ). Routine (basal) respiration reflects the state of activation of the tissue according to the ATP demand. It is usually controlled strongly by ATP turnover and partly by substrate oxidation and proton leak. UCR is an expression of excess capacity of the electron transport system relative to routine (basal) respiration.

#### Immunoblot analysis

Mice were treated with MitoQ as described above. After 20 days of treatment, the mice were sacrificed, their brains were dissected, and crude mitochondrial preparations were obtained by differential centrifugation. Briefly, one brain hemisphere was removed, washed extensively, minced, and homogenized with a small tissue grinder. Tissue fragments were disrupted using a Potter-Elvehjem homogenizer in homogenization buffer (110 mM sucrose, 60 mM morpholinepropanesulfonic acid, 0.5 mM EGTA, 1 g/L BSA, 3 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $KH_2PO_4$ , 20 mM Hepes, pH 7.1) and centrifuged 10 min at 1500 g, and mitochondria were isolated from the supernatant by centrifugation at 15,000 g for 10 min. Mitochondrial pellets were resuspended in a minimal volume of homogenization buffer. Mitochondrial proteins (50  $\mu$ g) were resolved by electrophoresis on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Thermo). The membranes were blocked for 1 h in TBS-T (Tris-buffered saline with 0.6% Tween 20) plus 5% BSA and probed for 60 min at room temperature with a rabbit polyclonal anti-3-nitrotyrosine antibody at a 1:1000 dilution [32] in BSA-TBS-T. After a wash in TBS-T, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:2500) was applied for 60 min at room temperature. Proteins were visualized with ECL

Western blotting substrate (Pierce Biotechnology).  $\beta$ -Actin was used as a loading control. Densitometric analysis was performed using ImageJ software.

#### Histological analysis and immunofluorescence

Transgenic and nontransgenic mice ( $n = 3$  per group) treated as described above for 20 days were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde fixative in PBS under deep anesthesia (pentobarbital, 50 mg/kg ip). The spinal cords were postfixed and embedded in Paraplast and 5- $\mu$ m-thick sections were obtained. Staining with toluidine blue was performed for motor neuron counting. For immunofluorescence studies, heating antigen retrieval with citrate buffer was performed in a microwave oven and endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide diluted in methanol when necessary. After permeabilization (0.2% Triton X-100 in PBS) and blocking of nonspecific antibody binding (2% BSA, 0.2% Triton X-100 in PBS), sections were incubated with the following primary antibodies: mouse monoclonal Cy-3-conjugated anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:600, overnight; Sigma), rabbit polyclonal anti-heme oxygenase-1 (HO-1, 1:400, overnight; Stressgen, Enzo Life Sciences), rabbit anti-3-nitrotyrosine (1:50, 72 h [32]) or goat anti-4-hydroxynonenal protein adducts (HNE, 1:100, 72 h; Abcam). GFAP-labeled sections were washed and mounted with glycerol. For HO-1 detection, a secondary AlexaFluor<sup>488</sup>-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1000; Molecular Probes, Life Technologies) was used. For 3-nitrotyrosine and HNE detection, goat anti-rabbit or donkey anti-goat peroxidase-linked secondary antibodies were applied for 1 h, and the enzymatic activity was detected using an AlexaFluor<sup>488</sup> tyramide signal amplification system (TSA kit; Molecular Probes). Sections in which primary antibody was omitted were included as negative controls. Images were captured by a Nikon digital camera coupled to a Nikon Eclipse TE 200 epifluorescence microscope.

#### Evaluation of motor neuron number, astrogliosis, and nitroxidative stress markers in the spinal cord

The number of motor neurons was quantified by counting every cell on lamina IX of Rexed displaying motor neuron morphology with nucleus and nucleolus on every fifth toluidine-blue-stained 5- $\mu$ m section (at least 25 sections per animal) through the lumbar spinal cord. ImageJ software (NIH) tools were used for astrogliosis and nitroxidative marker quantification. Astrogliosis was evaluated on images obtained from every fifth GFAP-immunostained section (20 sections from each group). Ventral horn area occupied by GFAP immunofluorescence was measured and expressed as a percentage of total ventral horn area in each section. Nitrotyrosine and HNE immunoreactivity in the spinal cord ventral horn were quantified by measuring mean gray value in at least 20 images from nonconsecutive sections per group. Mean gray value measured in images from negative control sections was subtracted from raw data. HO-1-immunoreactive glial-like cells were counted in the ventral horn from at least 10 sections per animal with the aid of a Cell Counter plug-in and expressed as the number of immunoreactive cells per area.

#### Neuromuscular junction measurements

The extensor digitorum longus (EDL) and the soleus muscles from the same animals used for oxygen consumption studies were dissected immediately after sacrifice. Muscles were immersed for 60 min in 0.5% paraformaldehyde in PBS, rinsed with PBS, and mechanically dissociated into small bundles of fibers. The teased fibers were incubated with a blocking buffer (50 mM glycine, 1% BSA, and 0.5% Triton X-100) for 3 h and then in tetramethylrhodamine-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (TMR-BgTx; 1:1500; Sigma) overnight at



4 °C. Fibers were washed in PBS and left overnight at 4 °C in glycerol–Tris, pH 8.8 (4:1), which was used as mounting medium for all the preparations. Images were acquired using an Olympus IX81 epifluorescence microscope. For each muscle the images of 15–35 neuromuscular junctions were taken and analyzed using Adobe Photoshop software. The total area, defined as the area delimited by the external outline of the TMR-BgTx-stained endplate marked with the Lasso tool, including both stained and unstained areas, was measured. The resulting numbers of selected pixels were counted with the Histogram tool. Data are expressed as a percentage of the neuromuscular junction total area from nontransgenic control animals.

### Statistics

Survival curves were compared by Kaplan–Meier analysis with the log-rank test using SigmaPlot 12 (Systat Software). Quantitative data were expressed as the mean  $\pm$  SEM and Student's *t* test or ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test was used for statistical analysis, with *p* < 0.05 considered significant. When the normality test failed, comparison of the means was performed by one-way ANOVA on ranks followed by the Kruskal–Wallis test. All statistics computations were performed using SigmaPlot 12 (Systat Software) or GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

## Results

### Orally administered MitoQ accumulated within mice tissues

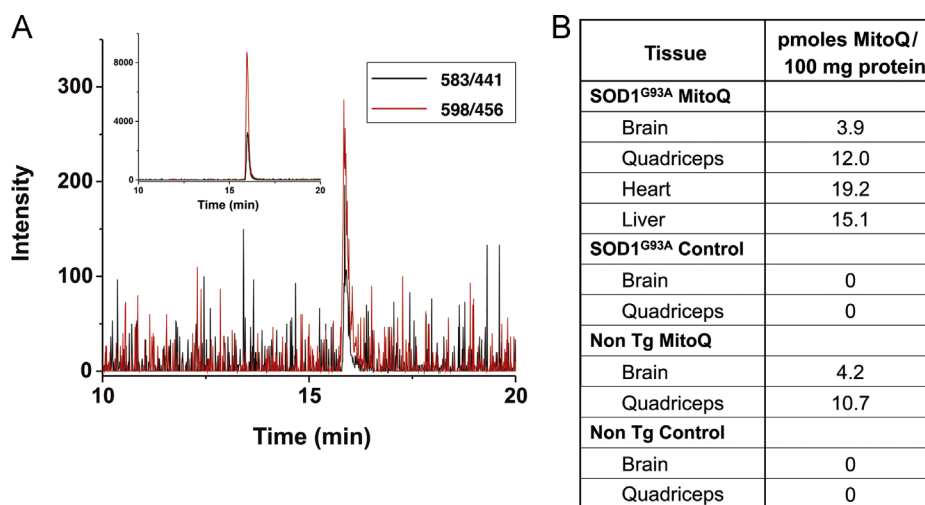
To evaluate the availability of MitoQ within tissues of orally treated mice, SOD1<sup>G93A</sup> mice and non-Tg littermates were administered 500  $\mu$ M MitoQ in their drinking water from early onset of symptoms (90 days of age) for 20 days. After sacrifice, tissue samples were obtained and analyzed by LC/ESI–MS/MS. We were able to detect MitoQ in brain, liver, heart, and muscle from the treated animals (Fig. 1). Typical LC/MRM chromatograms for MitoQ and d<sub>15</sub>-MitoQ standards are shown in Fig. 1A (inset). Extracted MitoQ and d<sub>15</sub>-MitoQ from the heart of a MitoQ-treated mouse are shown in Fig. 1A. The steady-state accumulation of MitoQ for various tissues is shown in Fig. 1B. Therefore, long-term administration of MitoQ in the drinking water led to the substantial steady-state accumulation of MitoQ within mouse brain, liver, heart, and muscle in our experiments.

### MitoQ administration slowed the mitochondrial function decline in lumbar spinal cord and muscle

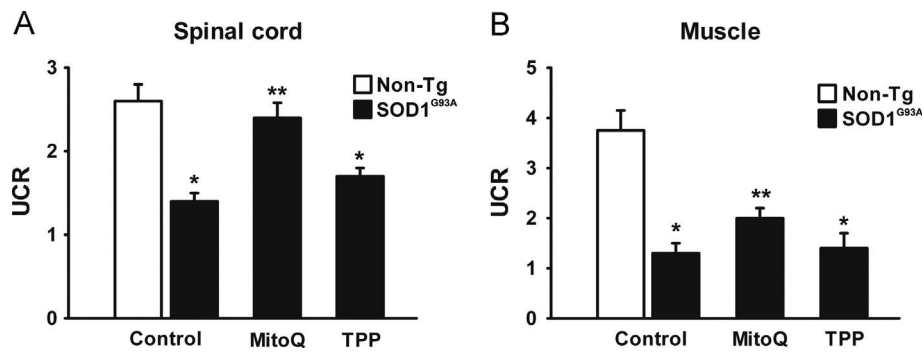
To assess whether oral administration of MitoQ was affecting mitochondrial function in target tissues we performed high-resolution respirometry in spinal cord and quadriceps muscle tissue obtained from non-Tg and SOD1<sup>G93A</sup> mice after 20 days of MitoQ or decylTPP treatment (from 90 days of age, at the beginning of symptoms). High-resolution respirometry in lumbar spinal cord and muscle tissue was monitored and the UCR was calculated. Nontransgenic animal tissues exhibited a basal respiratory rate of around 6–7 and 7–8 pmol O<sub>2</sub> s<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> for spinal cord and muscle, respectively; under maximal uncoupling conditions (FCCP) oxygen consumption increased threefold, a value that was decreased to 30% of basal with the addition of antimycin A. In SOD1<sup>G93A</sup> animals, basal respiratory rates were usually about 60% of nontransgenic animals. The average calculated UCR for spinal cord and quadriceps muscle of nontransgenic animals was 2.6 and 3.8, respectively, and was significantly decreased in the SOD1<sup>G93A</sup> mice as shown in Fig. 2. MitoQ-treated SOD1<sup>G93A</sup> mice exhibited an increase in spinal cord and quadriceps UCR relative to decylTPP-treated or control SOD1<sup>G93A</sup> mice, to a level similar to that shown for non-Tg mice (Fig. 2). MitoQ administration to non-Tg animals did not significantly affect UCR in either tissue. The mitochondrial function improvement was detected in both males and females without significant differences, so data from both genders were pooled.

### MitoQ administration decreased nitroxidative damage in the nervous system

Widespread oxidative damage to proteins, DNA, and lipids is described in ALS and supported by the finding of nitroxidative markers such as 3-nitrotyrosine, malondialdehyde, HNE, oxidized proteins, oxidized DNA, and membrane phospholipid peroxidation (reviewed in [33]). To find out whether MitoQ administration reduced nitroxidative damage we analyzed nitroxidative markers in the brain and the spinal cord of SOD1<sup>G93A</sup> mice after 20 days of treatment. MitoQ administration mitigated the previously described increase in 3-nitrotyrosine labeling in the nervous system of SOD1<sup>G93A</sup> mice, in both isolated brain mitochondria (Fig. 3A) and spinal cord ventral horn (Fig. 3B). In addition, we analyzed HNE immunoreactivity as a lipid peroxidation marker and found reduced



**Fig. 1.** MitoQ detection in brain, muscle, heart, and liver from orally treated mice. (A) Multiple-reaction monitoring of MitoQ (black line) and d<sub>15</sub>-MitoQ (red line) following 583/441 and 598/456 transitions, respectively. The graph shows a representative record from a heart sample of a MitoQ-treated SOD1<sup>G93A</sup> mouse. The inset shows the separation and detection of MitoQ and d<sub>15</sub>-MitoQ standards by HPLC/MS. (B) Summary of the quantification of MitoQ in the indicated tissues in terms of picomoles of MitoQ per 100 mg of proteins. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 2.** MitoQ improved mitochondrial respiratory function in spinal cord and muscle from SOD1<sup>G93A</sup> mice. Uncoupling control ratio (UCR) is shown for (A) spinal cord and (B) quadriceps muscle mitochondria from non-Tg or SOD1<sup>G93A</sup> mice treated with MitoQ or decylTPP (TPP) as indicated. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. \* $p < 0.05$ , significantly different from non-Tg control. \*\* $p < 0.05$ , significantly different from SOD1<sup>G93A</sup> control.

labeling in the spinal cord of MitoQ-treated compared to control SOD1<sup>G93A</sup> mice (Fig. 3C). In spinal cord slices from non-Tg animals, both 3-nitrotyrosine and HNE immunolabeling was very low, similar to that found in SOD1<sup>G93A</sup> spinal cord slices in which primary antibodies were omitted (negative controls, data not shown). As further proof that MitoQ reduced nitroxidative stress in this model, we studied the expression of an antioxidant-response element (ARE)-containing gene, HO-1, which has been described to be upregulated in glial cells in SOD1<sup>G93A</sup> rats [34]. We found that the number of glial-like HO-1-immunoreactive cells per area in the spinal cord of SOD1<sup>G93A</sup> mice was significantly reduced by MitoQ treatment (Fig. 3D). As previously described for SOD1<sup>G93A</sup> rats [34], some HO-1 immunoreactivity was found in neurons but not in glial-like cells in non-Tg mouse spinal cord (data not shown).

#### MitoQ administration reduced motor neuron loss and astrogliosis in the lumbar spinal cord

To further characterize the effects of MitoQ on SOD1<sup>G93A</sup> mice, another group of animals was sacrificed after 20 days of treatment to study the motor neuron population and GFAP immunoreactivity in the spinal cord as indicators of disease progression and astrogliosis, respectively. There was a significant preservation of motor neuron somas in the Rexed lamina IX of the spinal cord ventral horn from MitoQ-treated SOD1<sup>G93A</sup> mice compared to untreated mice (non-Tg,  $16.2 \pm 0.5$ ; control SOD1<sup>G93A</sup>,  $6.9 \pm 0.5$ ; MitoQ-treated SOD1<sup>G93A</sup>,  $10.0 \pm 0.3$ ; Fig. 4A). Accordingly, a marked reduction (54%) in GFAP content was detected in the spinal cord from MitoQ-treated SOD1<sup>G93A</sup> mice compared with the vehicle-treated group (Fig. 4B).

#### MitoQ administration preserved neuromuscular junctions

Alterations in neuromuscular junction morphology followed by axonal degeneration have been described as early events in both ALS animal models and patients [35]. To further analyze the effects of MitoQ treatment on SOD1<sup>G93A</sup> mice, we studied the acetylcholine receptor distribution in the postsynaptic element of the neuromuscular junction in EDL and soleus muscles using fluorescent bungarotoxin. After 20 days of MitoQ treatment, EDL neuromuscular junctions from SOD1<sup>G93A</sup> animals exhibited an increased postsynaptic area compared to untreated mice (Fig. 5). This effect was not seen in soleus muscles (data not shown).

#### MitoQ administration increased grip strength and prolonged survival of SOD1<sup>G93A</sup> mice

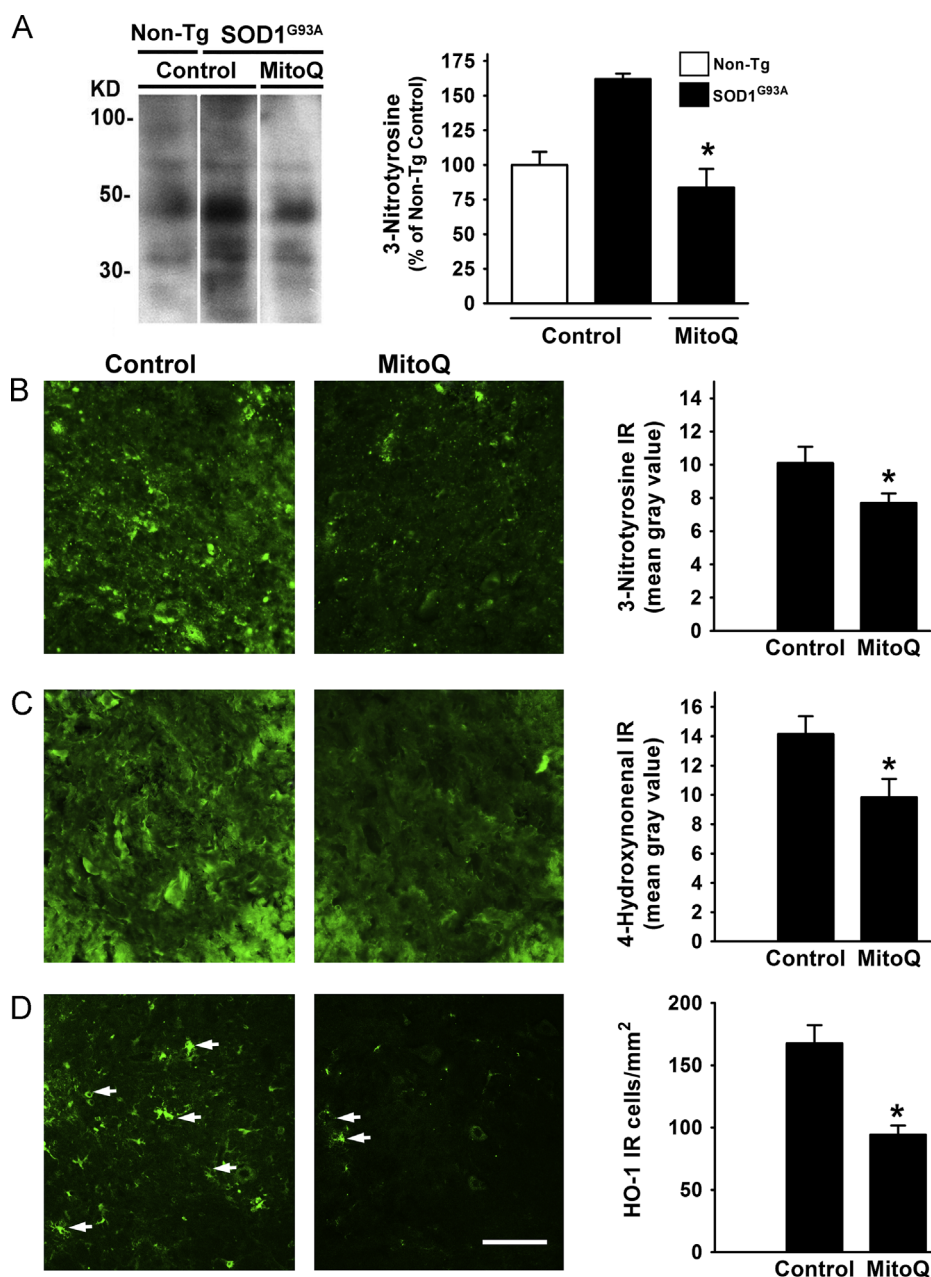
The MitoQ beneficial effects detected on SOD1<sup>G93A</sup> mouse mitochondrial function and spinal cord pathology prompted us

to test the effects of MitoQ on motor symptoms and life span of the animals. Chronic oral MitoQ administration to SOD1<sup>G93A</sup> mice significantly increased the mean survival in both males and females (males, control  $124.0 \pm 1.7$  days, MitoQ  $130.1 \pm 2.0$  days; females, control  $127.6 \pm 1.9$  days, MitoQ  $134.8 \pm 2.7$  days; Fig. 6A) as indicated by Kaplan–Meier survival analysis. Data from the decylTPP-treated group exhibited a large variability and were not statistically different from neither the MitoQ nor the control group (data not shown). Regarding the effects of MitoQ on motor performance of SOD1<sup>G93A</sup> mice, it is interesting to note that MitoQ administration significantly improved grip-strength performance at the end stage of the disease (Fig. 6B), although this effect could be detected only in female mice.

## Discussion

Our results show that oral administration of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ to SOD1<sup>G93A</sup> mice starting at the onset of the symptoms had a pharmacological effect extending survival and improving grip strength. This improved animal behavior was associated with a slower decline in mitochondrial respiratory activity in the spinal cord and muscle; reduction in nitroxidative stress markers, astrogliosis, and motor neuron loss in the spinal cord; and preservation of neuromuscular junctions.

Oxidative stress and mitochondrial alterations have long been associated with ALS. As a result, various antioxidant treatments have been assayed in the ALS animal models and found to be beneficial, as they slowed disease progression, including nitrones such as DMPO [36], nitroxides such as Tempol [37], and SOD1 mimetics [38,39]. Mitochondria are the main source of cellular reactive oxygen and nitrogen species (RONS), whose production further increases if mitochondria are damaged [40,41]. On the other hand, mitochondria themselves are a target of RONS, which can impair mitochondrial function [42]. In this context, the development of antioxidants that selectively concentrate in mitochondria provides an opportunity to decipher the impact of mitochondria-generated RONS in the pathogenesis and progression of ALS. The contribution of RONS-caused mitochondrial dysfunction to the neurodegenerative process may depend on the cell type involved [43]. We have previously shown that MitoQ prevented the increased susceptibility to trophic factor deprivation exhibited by motor neurons expressing SOD1<sup>G93A</sup> compared to non-Tg motor neurons [23]. We also provided evidence that MitoQ treatment of SOD1<sup>G93A</sup>-expressing astrocytes reduced nitroxidative stress and mitochondrial dysfunction exhibited by these cells and, importantly, reduced their toxicity to motor neurons in co-cultures [24]. These results were consistent with the now well-accepted proposal that mutant SOD1-mediated toxicity within

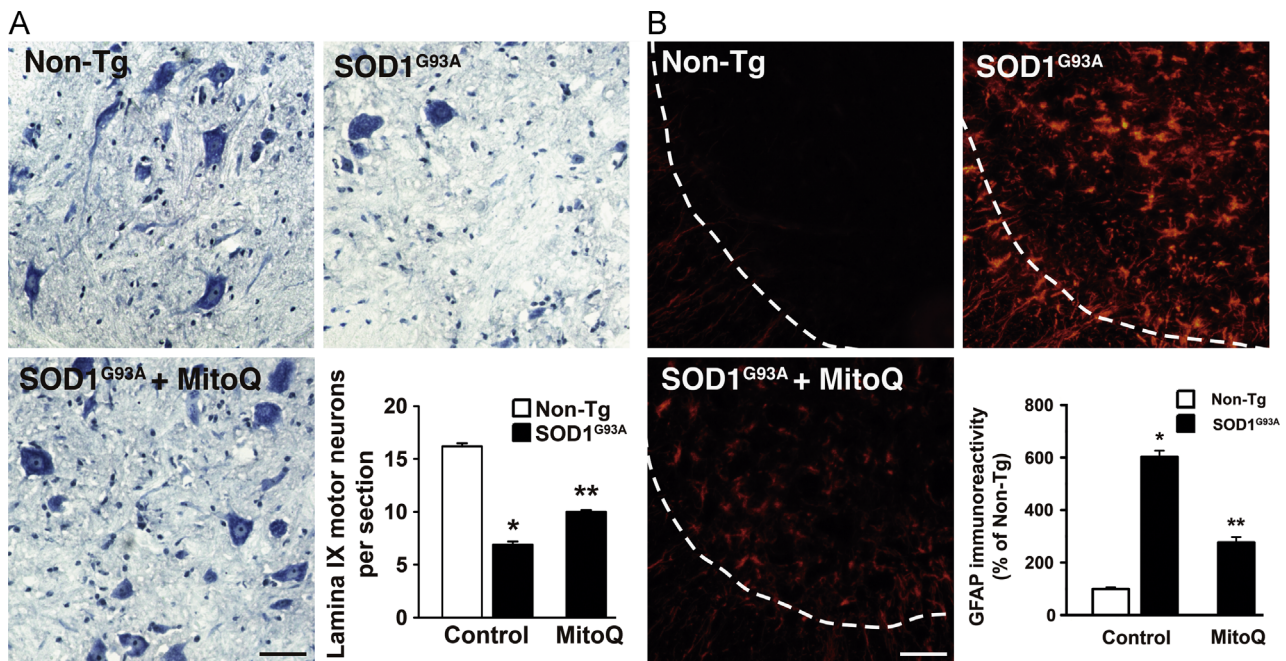


**Fig. 3.** MitoQ decreased nitrooxidative markers in SOD1<sup>G93A</sup> mouse central nervous system. (A) Representative 3-nitrotyrosine immunoblot of brain mitochondrial proteins from the indicated groups of mice. The graph on the right indicates relative densitometric levels of 3-nitrotyrosine expressed as a percentage of non-Tg control. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM from two blots assayed in duplicate. (B, C) Representative images and mean gray value quantification of immunofluorescence for (B) 3-nitrotyrosine and (C) 4-hydroxynonenal–protein adducts in the ventral horn of spinal cord sections from the indicated groups of animals. (D) Representative heme oxygenase-1 immunoreactivity in the same region described for (B) and (C). Note the glial-like immunoreactive cells (arrows). The graph on the right shows the quantification of the number of glial-like immunoreactive cells per area in the ventral horn of the spinal cord of the indicated groups of animals. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. \* $p < 0.05$ , significantly different from SOD1<sup>G93A</sup> control. Scale bar: 50  $\mu$ m (B, C) and 100  $\mu$ m (D).

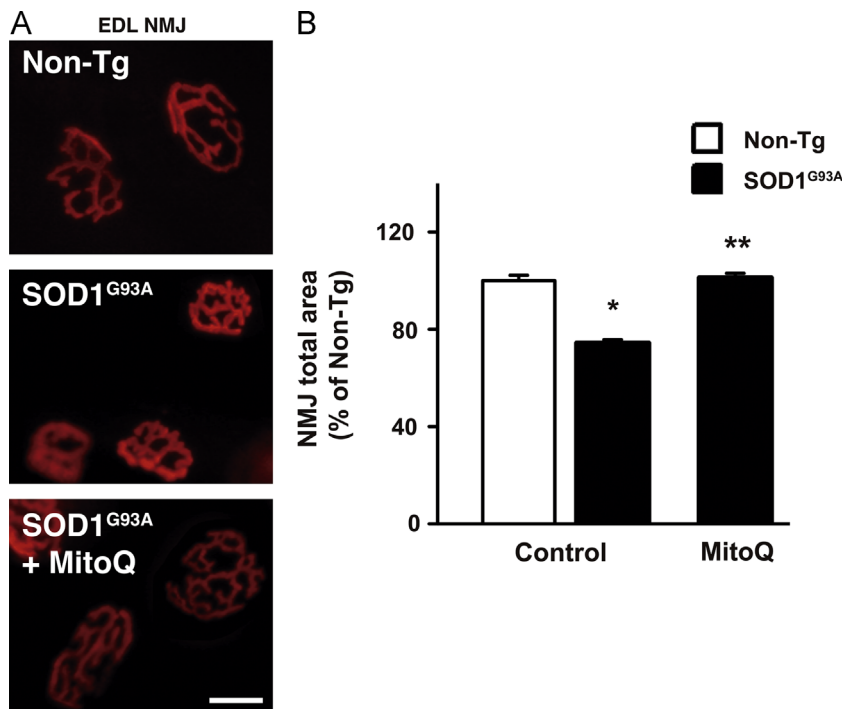
astrocytes and microglia is a central component of the mechanism of disease progression [44–46]. To further assess that hypothesis, in this work we analyzed the effects of chronic MitoQ administration to SOD1<sup>G93A</sup> mice. Oral administration of MitoQ to ALS mice showed a disease-modifying effect, which further provides a proof of principle that nitrooxidative stress at the mitochondrial level plays a significant role in the ALS pathological process. Within mitochondria, the ubiquinone moiety of MitoQ is reduced by complex II to its active ubiquinol form, which protects mitochondria against oxidative damage [14]. Indeed, in the reactions of a variety of oxidants with ubiquinol, the latter is oxidized to ubiquinone, which is readily reduced back to ubiquinol by the respiratory chain [47] and thus it is continually recycled. Therefore,

MitoQ neutralizes a variety of reactive oxygen and nitrogen species and maintains mitochondrial function. This was confirmed in our results by high-resolution respirometry, as the *in vivo* MitoQ treatment increased the UCR in isolated spinal cord and muscle tissue. We can affirm that this effect was due to the accumulation of ubiquinol within mitochondria instead of the lipophilic cation used to target MitoQ because UCR was reestablished only by MitoQ and not by decylTPP. The MitoQ-dependent ubiquinol cycle in mitochondria could potentially lead to ubisemiquinone radicals promoting increased superoxide radical formation in mitochondria and thus interfere with mitochondrial-derived hydrogen peroxide-dependent cellular signaling; however, the effect of long-term *in vivo* MitoQ administration on the production of





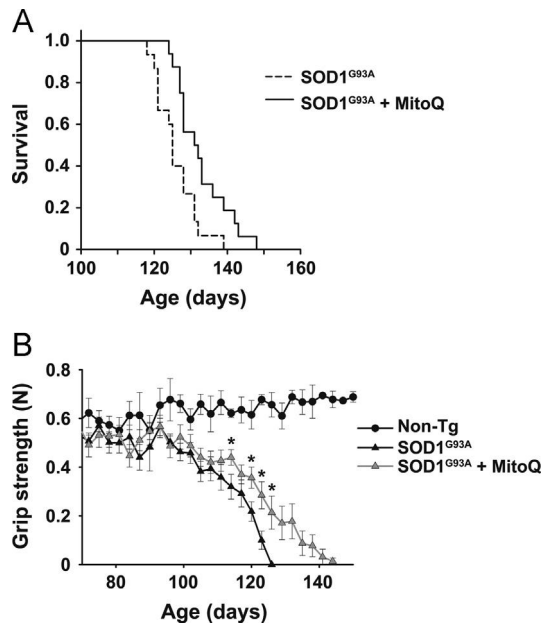
**Fig. 4.** MitoQ decreased motor neuron loss and astrocyte reactivity in the spinal cord of SOD1<sup>G93A</sup> mice. (A) Representative Nissl stain in ventral horn spinal cord sections from the indicated groups of mice. The graph indicates the number of neuronal somas located in Rexed lamina IX. (B) Representative GFAP immunofluorescence in ventral horn spinal cord sections from the indicated mice. Dotted lines indicate the limit between gray and white matter. The graph shows the GFAP-immunoreactive area in the ventral horn of the indicated groups of animals as a percentage of non-Tg control. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM from at least three animals per group. \* $p < 0.05$ , significantly different from non-Tg control; \*\* $p < 0.05$ , significantly different from SOD1<sup>G93A</sup> control. Scale bar: 50  $\mu$ m (A) and 100  $\mu$ m (B).



**Fig. 5.** MitoQ maintained motor unit integrity in SOD1<sup>G93A</sup> mice. (A) Representative EDL neuromuscular junctions from the indicated animals detected by TMR-BgTx labeling of acetylcholine receptors in the postsynaptic area. (B) Quantification of total TMR-BgTx-stained neuromuscular area in the EDL muscle from the different groups of animals. Data are expressed as a percentage of non-Tg control, mean  $\pm$  SEM from 60–100 neuromuscular junctions from two to four animals per group. \* $p < 0.05$ , significantly different from non-Tg control; \*\* $p < 0.05$ , significantly different from SOD1<sup>G93A</sup> control. Scale bar: 50  $\mu$ m.

reactive species and redox signaling has been explored in detail [27] and no effects on these processes were found. This is the first report of high-resolution oxymetry in living tissues (in contrast to measurements in isolated mitochondria) directly assessing a beneficial action of mitochondria-targeted antioxidants in respiratory function.

The reduced levels of nitroxidative markers detected in MitoQ-treated mice provide convincing evidence to sustain that the protective mechanisms of MitoQ include attenuation of oxidant formation *in vivo* as has been reported in other animal models tested [15]. In the present work MitoQ treatment decreased 3-nitrotyrosine levels in isolated brain mitochondria, confirming



**Fig. 6.** MitoQ increased survival and improved grip strength in orally treated SOD1<sup>G93A</sup> mice. (A) Kaplan–Meier survival curves from MitoQ-treated and control SOD1<sup>G93A</sup> mice. MitoQ was administered in drinking water from 90 days of age (symptoms onset) until death.  $n = 15$  or 16 animals per group. Data for both genders were pooled as no significant differences were detected among them.  $p < 0.05$ , Kaplan–Meier log-rank test. (B) Hindlimb grip strength records from non-Tg or SOD1<sup>G93A</sup> female mice treated with MitoQ or vehicle as indicated. MitoQ-treated non-Tg animals did not show differences from controls and data are not shown in order to simplify the graph. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM from 7–10 animals per group. \* $p < 0.05$ , significantly different from SOD1<sup>G93A</sup> control.

that damage by nitric oxide-derived oxidants is being halted within the organelle. Furthermore, HNE immunoreactivity was also decreased in the MitoQ-treated animals, demonstrating that nitroxidative damage in both proteins and lipids was simultaneously diminished. Indirect support is also provided by the reduced HO-1 immunoreactivity, as increased production of oxidants activates the Nrf2-mediated expression of ARE-containing genes, including HO-1. HO-1 expression is increased in reactive astrocytes in the spinal cord of symptomatic SOD1<sup>G93A</sup> rats [34]. The finding that MitoQ decreased the number of HO-1-immunoreactive glial-like cells in the SOD1<sup>G93A</sup> mice spinal cord suggests that reduced RONS-mediated signaling is occurring. In addition, it further supports the contribution of glial cells to ALS pathology. Taken together, our results suggest that reducing nitroxidative damage in mitochondria delays disease progression and pathological signs, offering a therapeutic alternative to include in ALS treatment.

A key requirement for drugs targeting the central nervous system (CNS) is to be able to cross the blood–brain barrier. In this study we were able to detect MitoQ accumulation in brain samples although in lower levels than in other assayed tissues, which probably reflects some limitation of MitoQ to cross the blood–brain barrier. Nonetheless, the levels found in brain were significant and large enough to provide pharmacological effects (*vide infra*). In addition, a recent study using 100  $\mu$ M MitoQ in drinking water showed benefits in a transgenic mouse model of Alzheimer disease [16] and also in the MPTP model of Parkinson disease [18], indicating that MitoQ was able to reach the CNS when administered in a lower dose.

It is interesting to note that MitoQ-treated animals retained increased grip strength until death compared with untreated SOD1<sup>G93A</sup> animals. Moreover, the EDL muscle fibers of MitoQ-treated mice displayed neuromuscular junctions with preserved size and shape, indicating that MitoQ could delay the progressive neuromuscular junction destruction characteristic of animals with

ALS [48]. The beneficial effects of MitoQ on motor performance were more pronounced in females than in males. However, the improvement in mitochondrial function was detected in both genders. Gender differences have been reported previously in SOD1<sup>G93A</sup> mutant rats [49] and mice [50–53]. In fact, the SOD1<sup>G93A</sup> mouse model shows sexual dimorphism, with females living slightly longer [54,55]. In addition, increased susceptibility to oxidative stress of brain cells from male mice compared to female has been demonstrated [56] and particularly increased transgenic SOD1 toxicity on males has also been reported [57]. These differences may explain the gender-dependent differential reaction to MitoQ treatment in grip strength compared to mitochondrial function.

Most therapeutic approaches reported in this mouse model of ALS to date have involved administration of agents long before onset of symptoms, which cannot currently be accomplished in ALS patients as most cases of the disease are sporadic and, consequently, presymptomatic assessment is not possible. In fact, another antioxidant mitochondria-targeted strategy used in the same mouse model, the cell-permeative peptide antioxidant SS-31, showed benefits, but the treatment was started at 30 days of age [58]. In the present study, we examined the effects of MitoQ administered at the symptom onset to judge its ability to extend survival and preserve motor function in mice that have already initiated the pathological process. Despite this, the MitoQ treatment delayed most pathological signs, indicating that the disease process can still be slowed, and further supports the potential use of MitoQ as a therapeutic option for ALS.

## Conclusions

This study supports the potential use of mitochondria-targeted antioxidants to treat ALS. Because mitochondrial dysfunction is a common feature of multiple neurodegenerative disorders [59], mitochondria-targeted antioxidant therapies could also be beneficial for other neurodegenerative diseases. In fact, MitoQ has been proven neuroprotective in animal models of Parkinson disease [18] and Alzheimer disease [16]. The fact that MitoQ has already been authorized for its use in humans [15] further raises the possibility of using it as a therapy to treat ALS and encourages a swift translation of these findings into clinical studies.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Universidad de la República (CSIC Grupos), Uruguay (to R.R.), and the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay (ANII-FCE 2011\_1\_6260 to J.M.S.); a fellowship from the ANII, Uruguay (to E. M.); the Medical Research Council, United Kingdom (to M.P.M.); and the Foundation for Research Science and Technology, New Zealand, and Antipodean Pharmaceuticals (to R.A.J.S.).

## References

- Turner, M. R.; Hardiman, O.; Benatar, M.; Brooks, B. R.; Chio, A.; de Carvalho, M.; Ince, P. G.; Lin, C.; Miller, R. G.; Mitsumoto, H.; Nicholson, G.; Ravits, J.; Shaw, P. J.; Swash, M.; Talbot, K.; Traynor, B. J.; Van den Berg, L. H.; Veldink, J. H.; Vucic, S.; Kiernan, M. C. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* **12**:310–322; 2013.
- Kawamata, H.; Manfredi, G. Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mech. Ageing Dev.* **131**:517–526; 2010.
- Estevez, A. G.; Crow, J. P.; Sampson, J. B.; Reiter, C.; Zhuang, Y.; Richardson, G. J.; Tarpey, M. M.; Barbeito, L.; Beckman, J. S. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* **286**:2498–2500; 1999.
- Raoul, C.; Estevez, A. G.; Nishimune, H.; Cleveland, D. W.; deLapeyriere, O.; Henderson, C. E.; Haase, G.; Pettmann, B. Motoneuron death triggered by a



- specific pathway downstream of Fas: potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* **35**:1067–1083; 2002.
- [5] Cassina, P.; Peluffo, H.; Pehar, M.; Martinez-Palma, L.; Ressa, A.; Beckman, J. S.; Estevez, A. G.; Barbeito, L. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J. Neurosci. Res.* **67**:21–29; 2002.
- [6] Cassina, P.; Pehar, M.; Vargas, M. R.; Castellanos, R.; Barbeito, A. G.; Estevez, A. G.; Thompson, J. A.; Beckman, J. S.; Barbeito, L. Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **93**:38–46; 2005.
- [7] Pehar, M.; Cassina, P.; Vargas, M. R.; Castellanos, R.; Viera, L.; Beckman, J. S.; Estevez, A. G.; Barbeito, L. Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **89**:464–473; 2004.
- [8] Orrell, R. W.; Lane, R. J.; Ross, M. A systematic review of antioxidant treatment for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Amyotrophic Lateral Scler.* **9**:195–211; 2008.
- [9] Kaufmann, P.; Thompson, J. L.; Levy, G.; Buchsbaum, R.; Shefner, J.; Krivickas, L. S.; Katz, J.; Rollins, Y.; Barohn, R. J.; Jackson, C. E.; Tiryaki, E.; Lomen-Hoerth, C.; Armon, C.; Tandan, R.; Rudnicki, S. A.; Reznia, K.; Sufit, R.; Pestronk, A.; Novella, S. P.; Heiman-Patterson, T.; Kasarskis, E. J.; Piro, E. P.; Montes, J.; Arbing, R.; Vecchio, D.; Barsdorf, A.; Mitsumoto, H.; Levin, B. Phase II trial of CoQ10 for ALS finds insufficient evidence to justify phase III. *Ann. Neurol.* **66**:235–244; 2009.
- [10] Atassi, N.; Ratai, E. M.; Greenblatt, D. J.; Pulley, D.; Zhao, Y.; Bombardier, J.; Wallace, S.; Eckenrode, J.; Cudkowicz, M.; Dibbernado, A. A phase I, pharmacokinetic, dosage escalation study of creatine monohydrate in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Scler.* **11**:508–513; 2010.
- [11] Smith, R. A. J.; Hartley, R. C.; Cocheme, H. M.; Murphy, M. P. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**:341–352; 2012.
- [12] Smith, R. A. J.; Hartley, R. C.; Murphy, M. P. Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes. *Antioxid. Redox Signaling* **15**:3021–3038; 2011.
- [13] Murphy, M. P.; Smith, R. A. J. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**:629–656; 2007.
- [14] Kelso, G. F.; Porteous, C. M.; Coulter, C. V.; Hughes, G.; Porteous, W. K.; Ledgerwood, E. C.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem.* **276**:4588–4596; 2001.
- [15] Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1201**:96–103; 2010.
- [16] McManus, M. J.; Murphy, M. P.; Franklin, J. L. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **31**:15703–15715; 2011.
- [17] Smith, R. A. J.; Porteous, C. M.; Coulter, C. V.; Murphy, M. P. Selective targeting of an antioxidant to mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **263**:709–716; 1999.
- [18] Ghosh, A.; Chandran, K.; Kalivendi, S. V.; Joseph, J.; Antholine, W. E.; Hillard, C. J.; Kanthasamy, A.; Kalyanaraman, B. Neuroprotection by a mitochondria-targeted drug in a Parkinson's disease model. *Free Radic. Biol. Med.* **49**:1674–1684; 2010.
- [19] Gurney, M. E.; Pu, H.; Chiu, A. Y.; Dal Canto, M. C.; Polchow, C. Y.; Alexander, D. D.; Caliendo, J.; Hentati, A.; Kwon, Y. W.; Deng, H. X.; et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**:1772–1775; 1994.
- [20] Howland, D. S.; Liu, J.; She, Y.; Goad, B.; Maragakis, N. J.; Kim, B.; Erickson, J.; Kulik, J.; DeVito, L.; Psaltis, G.; DeGennaro, L. J.; Cleveland, D. W.; Rothstein, J. D. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:1604–1609; 2002.
- [21] Clement, A. M.; Nguyen, M. D.; Roberts, E. A.; Garcia, M. L.; Boillee, S.; Rule, M.; McMahon, A. P.; Doucette, W.; Siwek, D.; Ferrante, R. J.; Brown Jr R. H.; Julien, J. P.; Goldstein, L. S.; Cleveland, D. W. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* **302**:113–117; 2003.
- [22] Ilieva, H.; Polymenidou, M.; Cleveland, D. W. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J. Cell Biol.* **187**:761–772; 2009.
- [23] Pehar, M.; Vargas, M. R.; Robinson, K. M.; Cassina, P.; Diaz-Amarilla, P. J.; Hagen, T. M.; Radi, R.; Barbeito, L.; Beckman, J. S. Mitochondrial superoxide production and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation in p75 neurotrophin receptor-induced motor neuron apoptosis. *J. Neurosci.* **28**:7777–7785; 2007.
- [24] Cassina, P.; Cassina, A.; Pehar, M.; Castellanos, R.; Gandelman, M.; de Leon, A.; Robinson, K. M.; Mason, R. P.; Beckman, J. S.; Barbeito, L.; Radi, R. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J. Neurosci.* **28**:4115–4122; 2008.
- [25] Levine, J. B.; Kong, J.; Nadler, M.; Xu, Z. Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia* **28**:215–224; 1999.
- [26] Ross, M. F.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells. *Biochem. J.* **411**:633–645; 2008.
- [27] Rodriguez-Cuenca, S.; Cocheme, H. M.; Logan, A.; Abakumova, I.; Prime, T. A.; Rose, C.; Vidal-Puig, A.; Smith, A. C.; Rubinsztein, D. C.; Fearnley, I. M.; Jones, B. A.; Pope, S.; Heales, S. J.; Lam, B. Y.; Neogi, S. G.; McFarlane, I.; James, A. M.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. Consequences of long-term oral administration of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ to wild-type mice. *Free Radic. Biol. Med.* **48**:161–172; 2010.
- [28] Li, Y.; Zhang, H.; Fawcett, J. P.; Tucker, I. G. Quantitation and metabolism of mitoquinone, a mitochondria-targeted antioxidant, in rat by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**:1958–1964; 2007.
- [29] Li, Y.; Fawcett, J. P.; Zhang, H.; Tucker, I. G. Transport and metabolism of MitoQ10, a mitochondria-targeted antioxidant, in Caco-2 cell monolayers. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**:503–511; 2007.
- [30] Gnaiger, E. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control*. Innsbruck: Oroboros MiPNet Publications; 2007.
- [31] Miquel, E.; Cassina, A.; Martinez-Palma, L.; Bolatto, C.; Trias, E.; Gandelman, M.; Radi, R.; Barbeito, L.; Cassina, P. Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* **7**:e34776; 2012.
- [32] Brito, C.; Naviliat, M.; Tiscornia, A. C.; Vuillier, F.; Gualco, G.; Dighiero, G.; Radi, R.; Cayota, A. M. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J. Immunol.* **162**:3356–3366; 1999.
- [33] Drechsel, D. A.; Estevez, A. G.; Barbeito, L.; Beckman, J. S. Nitric oxide-mediated oxidative damage and the progressive demise of motor neurons in ALS. *Neurotox. Res.* **22**:251–264; 2012.
- [34] Vargas, M. R.; Pehar, M.; Cassina, P.; Martinez-Palma, L.; Thompson, J. A.; Beckman, J. S.; Barbeito, L. 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. *J. Biol. Chem.* **280**:25571–25579; 2005.
- [35] Fischer, L. R.; Culver, D. G.; Tennant, P.; Davis, A. A.; Wang, M.; Castellano-Sanchez, A.; Khan, J.; Polak, M. A.; Glass, J. D. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* **185**:232–240; 2004.
- [36] Liu, R.; Li, B.; Flanagan, S. W.; Oberley, L. W.; Gozal, D.; Qiu, M. Increased mitochondrial antioxidative activity or decreased oxygen free radical propagation prevent mutant SOD1-mediated motor neuron cell death and increase amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mouse survival. *J. Neurochem.* **80**:488–500; 2002.
- [37] Linares, E.; Seixas, L. V.; Dos Prazeres, J. N.; Ladd, F. V.; Ladd, A. A.; Coppi, A. A.; Augusto, O. Tempol moderately extends survival in a hSOD1(G93A) ALS rat model by inhibiting neuronal cell loss, oxidative damage and levels of non-native hSOD1(G93A) forms. *PLoS One* **8**:e55868; 2013.
- [38] Crow, J. P.; Calingasan, N. Y.; Chen, J.; Hill, J. L.; Beal, M. F. Manganese porphyrin given at symptom onset markedly extends survival of ALS mice. *Ann. Neurol.* **58**:258–265; 2005.
- [39] Wu, A. S.; Kiaei, M.; Aguirre, N.; Crow, J. P.; Calingasan, N. Y.; Browne, S. E.; Beal, M. F. Iron porphyrin treatment extends survival in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **85**:142–150; 2003.
- [40] Beal, M. F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann. Neurol.* **58**:495–505; 2005.
- [41] Radi, R.; Cassina, A.; Hodara, R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol. Chem.* **383**:401–409; 2002.
- [42] Kowaltowski, A. J.; Vercesi, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:463–471; 1999.
- [43] Bolaños, J. P.; Moro, M. A.; Lizasoain, I.; Almeida, A. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: therapeutic implications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **61**:1299–1315; 2009.
- [44] Vargas, M. R.; Pehar, M.; Cassina, P.; Beckman, J. S.; Barbeito, L. Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *J. Neurochem.* **97**:687–696; 2006.
- [45] Nagai, M.; Re, D. B.; Nagata, T.; Chalazonitis, A.; Jessell, T. M.; Wichterle, H.; Przedborski, S. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat. Neurosci.* **10**:615–622; 2007.
- [46] Di Giorgio, F. P.; Carrasco, M. A.; Siao, M. C.; Maniatis, T.; Eggan, K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat. Neurosci.* **10**:608–614; 2007.
- [47] Cocheme, H. M.; Kelso, G. F.; James, A. M.; Ross, M. F.; Trnka, J.; Mahendiran, T.; Asin-Cayuela, J.; Blaikie, F. H.; Manas, A. R.; Porteous, C. M.; Adlam, V. J.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. Mitochondrial targeting of quinones: therapeutic implications. *Mitochondrion* **7**(Suppl):S94–102; 2007.
- [48] Dupuis, L.; Loeffler, J. P. Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**:341–346; 2009.
- [49] Suzuki, M.; Tork, C.; Shelley, B.; McHugh, J.; Wallace, K.; Klein, S. M.; Lindstrom, M. J.; Svendsen, C. N. Sexual dimorphism in disease onset and progression of a rat model of ALS. *Amyotrophic Lateral Scler.* **8**:20–25; 2007.
- [50] Kirkinetzos, I. G.; Hernandez, D.; Bradley, W. G.; Moraes, C. T. Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **53**:804–807; 2003.
- [51] Cudkowicz, M. E.; Pastuszka, K. A.; Sapp, P. C.; Mathews, R. K.; Leahy, J.; Pasinelli, P.; Francis, J. W.; Jiang, D.; Andersen, J. K.; Brown Jr R. H. Survival in transgenic ALS mice does not vary with CNS glutathione peroxidase activity. *Neurology* **59**:729–734; 2002.
- [52] Mahoney, D. J.; Rodriguez, C.; Devries, M.; Yasuda, N.; Tarnopolsky, M. A. Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **29**:656–662; 2004.

- [53] Alves, C. J.; de Santana, L. P.; dos Santos, A. J.; de Oliveira, G. P.; Duobles, T.; Scorisa, J. M.; Martins, R. S.; Maximino, J. R.; Chadi, G. Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res.* **1394**:90–104; 2011.
- [54] Choi, C. I.; Lee, Y. D.; Gwag, B. J.; Cho, S. I.; Kim, S. S.; Suh-Kim, H. Effects of estrogen on lifespan and motor functions in female hSOD1 G93A transgenic mice. *J. Neurol. Sci.* **268**:40–47; 2008.
- [55] Scott, S.; Kranz, J. E.; Cole, J.; Lincecum, J. M.; Thompson, K.; Kelly, N.; Bostrom, A.; Theodoss, J.; Al-Nakhala, B. M.; Vieira, F. G.; Ramasubbu, J.; Heywood, J. A. Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS. *Amyotrophic Lateral Scler.* **9**:4–15; 2008.
- [56] Giordano, G.; Tait, L.; Furlong, C. E.; Cole, T. B.; Kavanagh, T. J.; Costa, L. G. Gender differences in brain susceptibility to oxidative stress are mediated by levels of paraoxonase-2 expression. *Free Radic. Biol. Med.* **58C**:98–108; 2013.
- [57] Li, R.; Strykowski, R.; Meyer, M.; Mulcrone, P.; Krakora, D.; Suzuki, M. Male-specific differences in proliferation, neurogenesis, and sensitivity to oxidative stress in neural progenitor cells derived from a rat model of ALS. *PLoS One* **7**:e48581; 2012.
- [58] Petri, S.; Kiaei, M.; Kipiani, K.; Chen, J.; Calingasan, N. Y.; Crow, J. P.; Beal, M. F. Additive neuroprotective effects of a histone deacetylase inhibitor and a catalytic antioxidant in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **22**:40–49; 2006.
- [59] Schon, E. A.; Przedborski, S. Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* **70**:1033–1053; 2011.

## CAPÍTULO 2: MODULACIÓN METABÓLICA DE ASTROCITOS COMO BLANCO PARA PREVENIR LA MUERTE NEURONAL EN LA ELA

### INTRODUCCIÓN Y RACIONAL DEL ESTUDIO

En trabajos previos hemos demostrado que una adaptación metabólica caracterizada por una reducción en la respiración mitocondrial está detrás de la toxicidad hacia motoneuronas mediada por astrocitos (Miquel et al., 2012). En cultivos primarios de astrocitos SOD1G93A, el tratamiento con el modulador metabólico DCA mejoró tanto su actividad respiratoria mitocondrial como su capacidad para mantener la supervivencia de motoneuronas en cocultivo. Además, la administración de DCA a ratones SOD1G93A redujo la muerte neuronal, retrasó la progresión de signos motores y extendió la vida de los ratones (Miquel et al., 2012). El DCA es un inhibidor de las PDK, enzimas que fosforilan la subunidad E1 $\alpha$  de la PDH del PDC, inhibiendo su actividad de catálisis del piruvato a acetil-CoA (Holness et al., 2003). La inhibición de PDK mantiene la mayor parte de la PDH en su forma activa y, por lo tanto, el metabolismo del piruvato se dirige principalmente hacia la oxidación de glucosa a CO<sub>2</sub> en las mitocondrias. El sistema PDH/PDK actúa como un regulador clave de la respiración mitocondrial. Desempeña un papel esencial en el cambio metabólico de la OXPHOS a la glucólisis aeróbica que acompaña a la transformación maligna en el cáncer (W. Zhang et al., 2015).

La fosforilación reversible de PDH-E1 $\alpha$  que regula la actividad del PDC (Patel & Korotchkina, 2006) se logra mediante cuatro PDK (PDK1-4) y dos fosfatasa diferentes (PDP1-2), que se expresan de manera diferencial en distintos tejidos de mamíferos (Bowker-Kinley et al., 1998). La regulación del PDC, ya sea en los niveles de expresión o en la actividad enzimática contribuye a las diferencias en el fenotipo metabólico entre las neuronas y los astrocitos (Halim et al., 2010). Aunque la PDC está regulada por varios mecanismos, incluida la inhibición alostérica por acetil-CoA y NADH, la modificación covalente de la PDC es fundamental para la regulación a largo plazo de los procesos metabólicos. Se ha demostrado que todas las subunidades de PDC se expresan en astrocitos y neuronas cultivados, pero los astrocitos presentan inmunorreactividades significativamente más altas para todas las subunidades que las neuronas (Halim et al., 2010). Además, existen diferentes niveles de expresión de PDH quinasas y fosfatasas entre ambos tipos celulares, con mayor expresión de PDK2 y PDK4 en astrocitos en comparación con las neuronas. El control de los niveles de expresión de PDK permite que las células y tejidos regulen la actividad de PDC y, por lo tanto, las tasas de oxidación de glucosa y la respiración mitocondrial (Lydell et al., 2002). La expresión más alta de PDK2 y PDK4 en los astrocitos es consistente con el estado de fosforilación de PDH más alto, la actividad de PDC más baja y la

producción de lactato más alta que muestran estas células (Pellerin & Magistretti, 2012). Por lo tanto, el perfil diferente de expresión de isoformas de PDK entre astrocitos y neuronas ofrece un objetivo clave para regular la respiración mitocondrial en astrocitos. En este capítulo evaluamos los efectos de la modulación metabólica de la función mitocondrial en astrocitos mediante silenciamiento génico en la capacidad de sostener la supervivencia de motoneuronas.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se realizaron cultivos primarios de astrocitos de rata SOD1G93A, en los cuales se inhibió la expresión de la enzima PDK2 utilizando siRNA específicos. Se evaluó el efecto del tratamiento sobre varios aspectos del fenotipo neurotóxico de dichos astrocitos: expresión de PDK y actividad PDH, actividad respiratoria mitocondrial (medida de tasas de consumo de oxígeno en presencia de sustratos de la cadena respiratoria), cambios en aspectos morfológicos de la red mitocondrial (tamaño de mitocondrias, nivel de fragmentación de la red mitocondrial), acumulación de inclusiones lipídicas citoplasmáticas (reflejo de cambios metabólicos en las células), y la capacidad para mantener la supervivencia de motoneuronas en cocultivo. Se analizó el efecto del silenciamiento en simultáneo del factor Nrf2 sobre la supervivencia neuronal alcanzada con el silenciamiento de PDK2.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *MATERIALES*

Todos los medios de cultivo y suero fueron adquiridos en Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las placas y frascos de cultivo son Nunc (Thermo Fisher Scientific). El resto de los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Merck) a no ser que se especifique lo contrario.

### *CONSIDERACIONES ÉTICAS*

Los procedimientos que implicaron la utilización de animales se realizaron siguiendo las pautas internacionales y aprobados por la Comisión honoraria de experimentación animal de la Universidad de la República <http://www.chea.csic.edu.uy>; CHEA), protocolo #1038.

## ANIMALES

Las ratas (*Rattus norvegicus*) se alojaron en un ambiente controlado (ciclo luz-oscuridad de 12 horas;  $20 \pm 1$  °C), con acceso al alimento y agua *ad libitum*. No más de seis hembras o machos por jaula.

Las ratas macho transgénicas hemicigotas NTac: SD-Tg (SOD1G93A) L26H fueron adquiridas de Taconic (Hudson, NY, USA) y se cruzaron con ratas Sprague–Dawley. Los neonatos se genotiparon por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como fue descrito previamente (Howland et al., 2002). Para los estudios se utilizaron animales hemicigotas para el SOD1G93A y sus compañeros de camada no Tg.

## CULTIVOS DE ASTROCITOS

Los cultivos de astrocitos espinales fueron realizados partiendo de neonatos de rata SOD1G93A o no Tg, genotipados por PCR, de acuerdo al protocolo de Saneto and De Vellis (Saneto & De Vellis, 1987) con leves modificaciones (Cassina et al., 2002). Brevemente, se disecó la médula espinal, removiendo cuidadosamente las meninges y el tejido fue cortado en pequeños pedazos con bisturí y disociado enzimáticamente con 0.25% tripsina-EDTA por 25 min a 37 °C. La tripsinización se detuvo con medio s-DMEM. Se adicionó ADNasa I (50 µg/mL) y se disgregó mecánicamente utilizando una micropipeta de 1000 µL. La suspensión celular se pasó por una malla de 80-µm y se centrifugó por 10 min a 300 × g. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio DMEM suplementado y se plaquearon a una densidad  $1.5 \times 10^6$  células por frasco de 25 cm<sup>2</sup>. Tras cambios de medio cada 48-72 h, al alcanzar confluencia los cultivos se agitaron por 48 h a 400 rpm, y luego fueron tratados por 48 h con Ara-C para eliminar células que sigan proliferando (fundamentalmente microglía contaminante). Finalmente, los cultivos purificados de astrocitos se amplificaron mediante su tripsinización y plaqueo a menor densidad ( $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) en el sustrato adecuado para los experimentos siguientes (placas de Petri de 60 mm para qPCR y western blot, placas Seahorse XFe de 24 pocillos para experimentos de consumo de oxígeno, placas estándar de 24 pocillos para experimentos de cocultivo, o cámaras de cubreobjetos Lab-Tek de 4 pocillos para microscopía de fluorescencia). Los cultivos se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% SFB.

## CULTIVOS DE MOTONEURONAS

Los cultivos enriquecidos en motoneuronas espinales se obtuvieron a partir de embriones de 15 días (E15) de ratas Wistar mediante una combinación de centrifugación diferencial e inmunoselección de

acuerdo al procedimiento descrito en (Henderson et al., 1995) con algunas modificaciones (Cassina et al., 2002). Brevemente, las médulas espinales fueron disecadas, se removieron sus meninges y se aisló la región ventral de la médula separándola del asta dorsal con bisturí. Las regiones ventrales fueron fraccionadas y tripsinizadas en PBS en presencia de 0,02% tripsina durante 12 minutos a 37 °C. El proceso de tripsinización se detuvo por el agregado de medio de cultivo L15 completo (L15 de Leibovitz suplementado con: bicarbonato de sodio (22 mM), glucosa (20 mM), insulina (5 µg/mL), progesterona (21 nM), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL), suero de caballo (2%) y 0,1% BSA). Seguidamente se procedió a la disociación mecánica del tejido en presencia de 0,02 mg/mL de DNAasa-1 en medio L15 completo, las células se separaron del detrito por centrifugación sobre un colchón de BSA (4%, 300g, 10 minutos). El precipitado celular fue resuspendido y sometido a una centrifugación diferencial sobre un colchón de Optiprep (1:10 en L15, 800 x g, 15 min). Este paso enriquece en motoneuronas la fracción en la interfase medio – optiprep (>70%). Posteriormente se realizó un paso adicional de purificación mediante inmunoafinidad empleando un anticuerpo monoclonal contra el receptor de neurotrofinas P75 (sobrenadante de hibridoma IgG192), en donde la suspensión celular se incubó 1 hora en placas de bacteriología pretratadas con este anticuerpo. Las células no adherentes fueron desechadas y las motoneuronas adheridas se eluyeron por lavado con sobrenadante de hibridoma IgG192. Finalmente, las motoneuronas fueron colectadas por centrifugación en un colchón de BSA y se resuspendieron en medio de cultivo para su posterior plaqueo en cocultivo con astrocitos.

#### *COCULTIVOS ASTROCITOS - MOTONEURONAS*

Las motoneuronas espinales purificadas se plaquearon a una densidad de 300 células/cm<sup>2</sup> sobre monocapas de astrocitos confluentes en medio L15 completo. Los tratamientos de los astrocitos se realizaron 24-48 h antes del plaqueo de motoneuronas. Las monocapas fueron previamente lavadas tres veces con PBS para remover restos de los tratamientos.

#### *TRANSFECCIÓN DE SIRNA*

Monocapas 70% confluentes de astrocitos espinales neonatales fueron cambiadas a medio DMEM suplementado con 2% de FBS antes de los tratamientos (400 µL por pocillo para placas de 24 pocillos). La transfección de siRNA se realizó utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Brevemente, para pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos, se mezcló 1 µL de Lipofectamine 2000 con 50 µL de medio Opti-Mem (Gibco) por pocillo y por otro lado se diluyeron 20 pmol de siRNA en 50 µL de Opti-



Mem. Se combinaron las soluciones y se incubó por 15 min a temperatura ambiente, luego de lo cual se agregó la solución combinada al pocillo con los astrocitos. Los astrocitos se transfectaron con 40 nM de siRNAs prediseñados Silencer® Select (Ambion) contra PDK2 (#4390771), PDK1 (#4390771), siRNA control negativo sin blanco en el transcriptoma (NC siRNA, Negative Control No. 1 siRNA, #4390843), o siRNA contra Nrf2 (Dicer substrate siRNA, IDT, RNC.RNAI.N031789.12.2) 24 h antes del aislamiento de ARN total utilizando Trizol (Ambion) para qPCR, o 48 h antes del aislamiento de proteínas para western blot o de los experimentos de cocultivo.

### *WESTERN BLOT*

Monocapas de astrocitos en placas de Petri de 60 mm fueron tratadas con siRNA contra PDK2, PDK1, siRNA NC como se explica más arriba, o DCA 5 mM. Luego de 48 h de tratamiento, se extrajeron las proteínas utilizando SDS al 1% suplementado con ortovanadato de sodio 2 mM y cóctel inhibidor de proteasas (Roche). Las muestras de lisados celulares fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con 5% BSA en PBS por 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios disueltos en PBS + 5% BSA + 0,1% tween-20, luego se lavaron con PBS + 0,1% tween-20, se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios y nuevamente se lavaron con PBS + 0,1% tween-20. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: phosphodetect anti- PDH-E1a(pSer293) (conejo, 1:800, Calbiochem #AP1062), anti Pyruvate Dehydrogenase E1-alpha (ratón, 1:800, Abcam #ab110334) y anti  $\beta$ -actina (ratón, 1:4000; Sigma-Aldrich #A5441). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG antibody (LI-COR Biosciences #926-32210) y IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG antibody (LI-COR Biosciences #925-68071). La detección y cuantificación se realizó utilizando el Sistema LI-COR Odyssey y el software incluido. Se cuantificaron los niveles relativos de PDH fosforilada (pSer293) y PDH total y se normalizó con relación a las células tratadas con vehículo.

### *QPCR*

Monocapas de astrocitos en placas de Petri de 60 mm fueron tratadas con siRNA contra PDK2, PDK1, siRNA NC como se explica más arriba. Luego de 24 h de tratamiento, se extrajo el ARN total utilizando Trizol (Thermo Fisher Scientific), seguido de extracción con cloroformo y precipitación con isopropanol. Se eliminó posibles contaminaciones de ADN utilizando un ADNasa (DNase-free, Thermo Fisher Scientific). La calidad del ARN extraído se evaluó por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, y se cuantificó el ARN utilizando un equipo NanoDrop 1000 (Thermo Fisher

Scientific). Se retrotranscribió el ARN utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante: En un tubo se combinó 1  $\mu\text{L}$  de oligo(dT)<sub>15</sub> 100  $\mu\text{M}$ , 500 ng de ARN total, 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM y agua hasta 12  $\mu\text{L}$ . Se incubó 5 min a 56  $^{\circ}\text{C}$  y luego en hielo. Luego se agregó 4  $\mu\text{L}$  de buffer 5x, 2  $\mu\text{L}$  de DTT 100 mM y 1  $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNAsas RNaseOUT (40 U/ $\mu\text{L}$ , Thermo). Se mezcló y se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 2 min, luego de lo cual se agregó 1  $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa M-MLV (200 U). Se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 50 min y finalmente a 70  $^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Para las reacciones de qPCR, se utilizaron 25 ng del ADNc en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  por tubo, el master mix conteniendo SYBR green Quantimix Easy master mix (Biotools). Todas las reacciones se realizaron en triplicado. Los cebadores utilizados (IDT, Integrated DNA Technologies) fueron: para GAPDH F: 5'-CAC TGA GCA TCT CCC TCA CAA-3' y R: 5'-TGG TAT TCG AGA GAA GGG AGG-3', para PDK2 F: 5'- TCA GCT AGG GGC CTT CTC TT-3' y R: 5'- CCG TAC CCC AGG GGA TAG AT-3'. La amplificación se realizó utilizando un termociclador Rotor-Gene 6000 System (Corbett Life Science), siguiendo el siguiente esquema: 95  $^{\circ}\text{C}$  (10 min) y 40 ciclos de 95  $^{\circ}\text{C}$  (15 s), 56  $^{\circ}\text{C}$  (30 s), 72  $^{\circ}\text{C}$  (30 s), seguido de curva de melting. Utilizamos los ciclos 15–23 para definir el Ct y calcular la expresión relativa de los genes de interés. Los datos fueron analizados utilizando el software Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). La cuantificación se realizó siguiendo el método del  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , utilizando astrocitos tratados con vehículo como control negativo y GAPDH como el ARNm de referencia.

### RESPIROMETRÍA

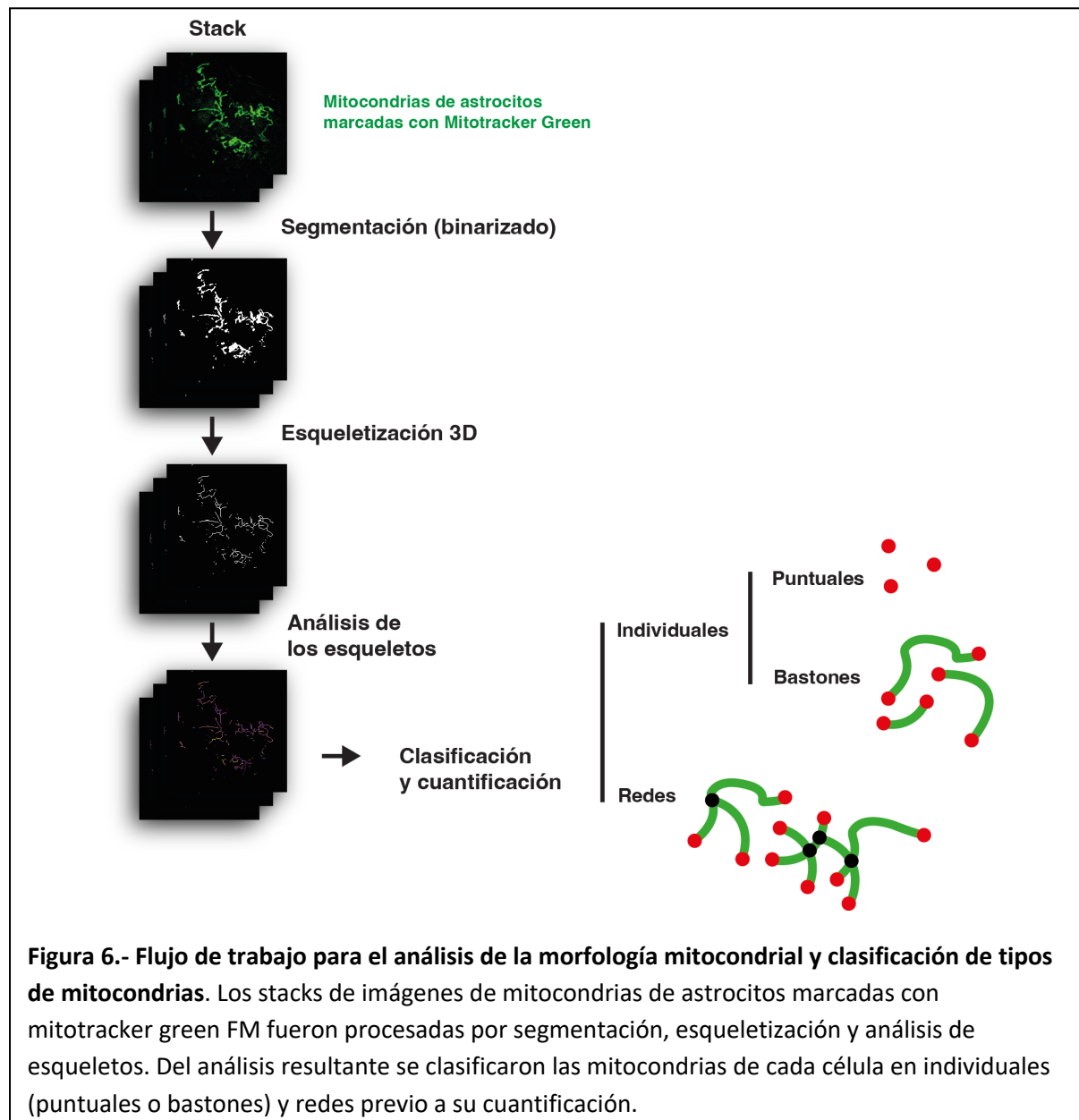
La tasa de consumo de oxígeno (OCR, por *oxygen consumption rate*) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR, por *extracellular acidification rate*) se midieron en astrocitos utilizando un analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24 (Agilent). Los astrocitos fueron tratados por 48 h con siRNA o DCA como se explicó anteriormente. Antes del experimento, el medio de cultivo fue reemplazado con un medio sin tampón (DMEM pH 7.4, suplementado con glucosa 5 mM, piruvato de sodio 1 mM, NaCl 32 mM, y glutamina 2 mM) y se incubaron las células por 1h a 37  $^{\circ}\text{C}$  sin  $\text{CO}_2$ . Se registraron las tasas basales de consumo de oxígeno al comienzo del ensayo, seguido de adiciones secuenciales de oligomicina (0,5  $\mu\text{M}$ ), carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP; 2  $\mu\text{M}$ ), y antimicina A (aA; 1  $\mu\text{M}$ ) + rotenona (1  $\mu\text{M}$ ). Realizando 3 medidas en cada paso. Se determinaron los siguientes parámetros bioenergéticos: Respiración basal (última medida de OCR antes de la adición de oligomicina) - (OCR mínima luego de la adición de rotenona/aA); respiración independiente de ATP: (respiración resistente a oligomicina) - (OCR mínima luego de la adición de rotenona/aA); respiración vinculada a producción de ATP: (última OCR antes de la adición de oligomicina) - (OCR mínima luego de la adición de oligomicina); respiración máxima: (OCR máxima luego de la adición de FCCP) - (OCR mínima luego de la adición de rotenona/aA); capacidad respiratoria

de reserva: respiración máxima – respiración basal. Luego de cada ensayo, se determinó el contenido proteico de cada pocillo en  $\mu\text{g}$  utilizando la técnica del ácido bicinconínico (BCA). Las OCR y ECAR se normalizaron en función de los  $\mu\text{g}$  de proteínas. Se determinaron también los siguientes índices respiratorios, que al ser relaciones entre los parámetros están internamente normalizadas (Brand & Nicholls, 2011): Eficiencia de acoplamiento (relación entre la respiración ligada a producción de ATP y la respiración basal) y índice de control respiratorio (RCR; la relación entre la tasa de respiración máxima y la resistente a oligomicina).

#### *ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL*

Astrocitos en cámaras de cubreobjetos Lab-Tek de 4 pocillos (Thermo Scientific) fueron tratados como se mencionó anteriormente con vehículo, siRNA NC, siRNA contra PDK2 o con DCA 5 mM. Luego de 48 h de tratamiento, las células se incubaron con MitoTracker Green FM 100 nM (Thermo Fisher Scientific #M7514) durante 30 min en DMEM sin FBS como indica el fabricante, se lavaron y se adicionó DMEM + 10% FBS. Las células se visualizaron por microscopía confocal con un microscopio Leica TCS-SP5-II (Leica Microsystems) usando un objetivo de inmersión en aceite HCX PL APO 63x/1.40. Se obtuvieron grupos de imágenes apiladas (z-stacks) con un paso de 0,2  $\mu\text{m}$  y al menos 10 planos por células. Se obtuvieron imágenes de al menos 25 células por grupo en 4 experimentos independientes. Los stacks de imágenes fueron procesados por deconvolución utilizando el software Huygens Professional (Scientific Volume Imaging). El posterior procesamiento y análisis de la morfología mitocondrial se realizó utilizando el software FIJI (NIH). A partir de cada stack correspondiente a un campo del microscopio confocal se extrajeron stacks correspondientes a células individuales. Todo el procesamiento posterior se realizó en tres dimensiones, manteniendo el stack (Figura 6). Se realizó la segmentación de las mitocondrias mediante binarización por umbralización, estableciendo un umbral adecuado para cada experimento. Las imágenes se procesaron para eliminar ruido en la imagen binaria. A continuación, se procedió a la esqueletización de los stacks con la herramienta “Skeletonize 3D”, obteniéndose para cada objeto (mitocondria) un esqueleto lineal en 3 dimensiones, equidistante de los bordes. Finalmente, sobre las imágenes esqueletizadas se aplicó el plugin “AnalyzeSkeleton (2D/3D)”, que permite extraer varios parámetros de los objetos presentes en el stack. Estos parámetros incluyen su longitud total, el número de ramificaciones (segmentos lineales), el número de puntos de unión y la longitud promedio de cada segmento, datos que son muy útiles para el análisis de las características de la red mitocondrial. En base a los parámetros obtenidos se clasificaron las morfologías mitocondriales A partir de estos datos se clasificaron las morfologías mitocondriales siguiendo criterios establecidos previamente (Leonard et al., 2015; Valente et al., 2017), en 2 grupos, **individuales** o **redes**. Las individuales no presentan ramificaciones, mientras que las redes sí. Las

mitocondrias individuales a su vez se subdividen en **puntuales** (puntiformes, representadas por 1 único voxel en el esqueleto) y **bastones** (con dos véxeles terminales y ninguno de ramificación). Las **redes** o mitocondrias **ramificadas** presentan más de dos véxeles terminales y al menos un voxel de ramificación. Para cada célula se cuantificó el número de mitocondrias individuales, el número de ramificadas, la longitud promedio mitocondrial, y la longitud media de bastones o ramas. Para este último parámetro consideramos en conjunto a los bastones y las ramas individuales de las redes, asumiendo que las fuerzas biológicas que determinan la longitud de las mitocondrias individuales en bastón y de las ramas de una red mitocondrial son similares (Valente et al., 2017). Se obtuvieron datos de al menos 25 células por tratamiento, repitiéndolo en cuatro experimentos independientes.



### *MARCADO Y CUANTIFICACIÓN DE INCLUSIONES LIPÍDICAS*

Cultivos subconfluentes de astrocitos en láminas con cámara Lab-Tek de 4 pocillos (Thermo Scientific) con DMEM 2% FBS fueron tratados como se indicó previamente con vehículo, siRNA NC, siRNA contra PDK2 o DCA 5 mM. 48 h después, las células se lavaron con PBS y fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS por 18 min sobre hielo. Luego de un lavado con PBS, las células fueron permeabilizadas por 30 min con Tritón X-100 al 0,2% en PBS. A continuación se incubaron con solución de bloqueo (SB): 10% suero de cabra, 2% BSA, y 0,1% Tritón X-100 en PBS, por 1 h a temperatura ambiente. Luego las células se incubaron toda la noche con anticuerpo primario contra GFAP, marcador astrocitario (conejo, 1:500; Sigma-Aldrich #G9269) en SB, seguido de 3 lavados de 5 min con PBS y finalmente incubación con el anticuerpo secundario anti conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (cabra, 1:1000, Thermo Fisher Scientific, # A-11034) por 1 h a temperatura ambiente. Luego de dos lavados con PBS, se incubó a las células por 30 min con Oil Red O (ORO; solución stock de ORO: 0,625% ORO en 99% alcohol isopropílico, preparada por una agitación de 2h. Solución de trabajo: 1,5 partes de solución stock de ORO y 1 parte de agua, incubados por 10 min a 4 °C y filtrado por filtro de 45 µm). Luego de la incubación con ORO, las células se lavaron con PBS y fueron incubadas con Hoechst 33342 (1 µg/mL; Sigma-Aldrich #14533) por 15 min para marcar los núcleos, y se montaron en glicerol al 80%. Las imágenes de las células fueron obtenidas con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 acoplado a una cámara Nikon Ds-Fi3, utilizando un objetivo 40x. Se obtuvieron al menos 25 imágenes por grupo en tres experimentos independientes. La cuantificación de las gotas lipídicas se realizó con el software FIJI. Se contó el número de partículas positivas para ORO en cada imagen con el comando "Analyze particles".

### *ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA DE MOTONEURONAS*

Los cocultivos astrocito-neurona se fijaron con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,1% en PBS, por 15 min sobre hielo. Luego de un lavado con PBS, las células fueron permeabilizadas con 0.2% Triton X-100 por 30, seguido de incubación en SB por 1h a temperatura ambiente. Las células se incubaron toda la noche a 4 °C con un anticuerpo primario anti  $\beta$ III-tubulina (1:3000; Abcam, #ab18207), luego se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1:500, Thermo Fisher Scientific, #31,460) por 1 h seguido por tres lavados con PBS. Finalmente, las células se incubaron con peróxido de hidrógeno y la reacción se reveló con 3,3'-diaminobenzidina. La supervivencia de motoneuronas se midió contando las células que presentaran neuritas más largas que cuatro diámetros del soma con un microscopio Nikon Eclipse TE 200.

## *ESTADÍSTICA*

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Graphpad Prism 9. Los datos se presentaron como media  $\pm$  SEM de valores obtenidos por al menos tres cultivos preparados independientemente en duplicados o triplicados. Los tests usados fueron one-way ANOVA seguido de múltiples comparaciones con el test de Tukey. Se estableció la significancia estadística como  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

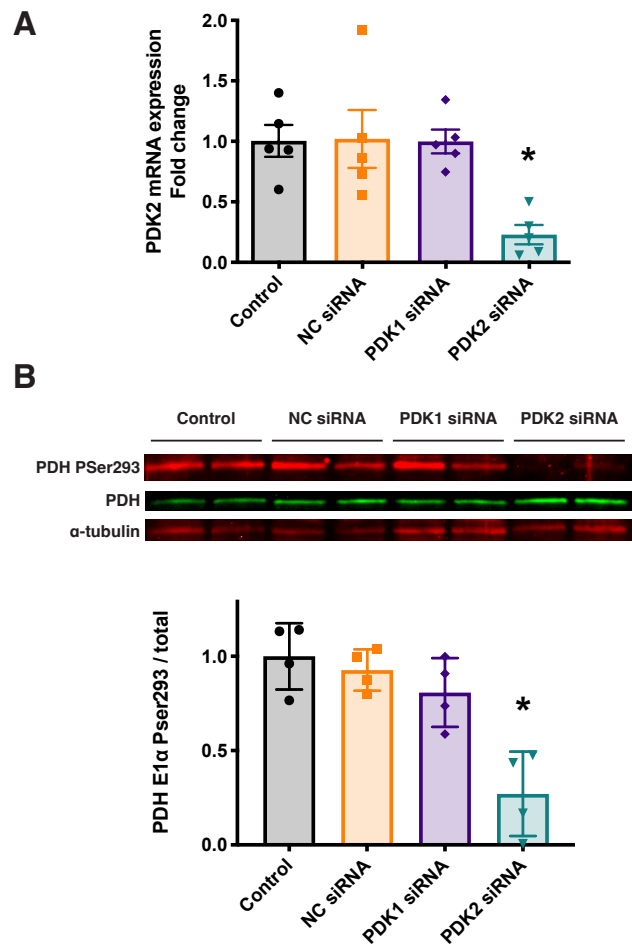
### *EL SILENCIAMIENTO DEL ARNM DE PDK2 REDUJO LA FOSFORILACIÓN DE PDH EN ASTROCITOS*

Para inhibir la expresión de PDK2 en astrocitos en cultivo, monocapas confluentes fueron incubadas con siRNA para PDK2, PDK1, o siRNA sin blancos como control negativo (NC). La incubación con siRNA contra PDK2 redujo la expresión del mensajero de PDK2, pero no de PDK1, medido por PCR cuantitativa (Figura 7A). Además, de manera relevante, este tratamiento disminuyó los niveles de fosforilación de PDH en los astrocitos sin modificar la expresión de PDH total entre los diferentes grupos estudiados, una medida indirecta de la actividad PDK en la célula. Esto fue detectado por western blot con anticuerpos específicos y cuantificado como los niveles de PDH fosforilada sobre los de PDH total (Figura 7B). No se encontraron diferencias en los niveles de PDH fosforilada en relación a la PDH total en los astrocitos tratados con los siRNA para PDK1 ni siRNA NC.

### *EL SILENCIAMIENTO DEL ARNM DE PDK2 EN ASTROCITOS SOD1G93A AUMENTÓ LOS PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS MITOCONDRIALES*

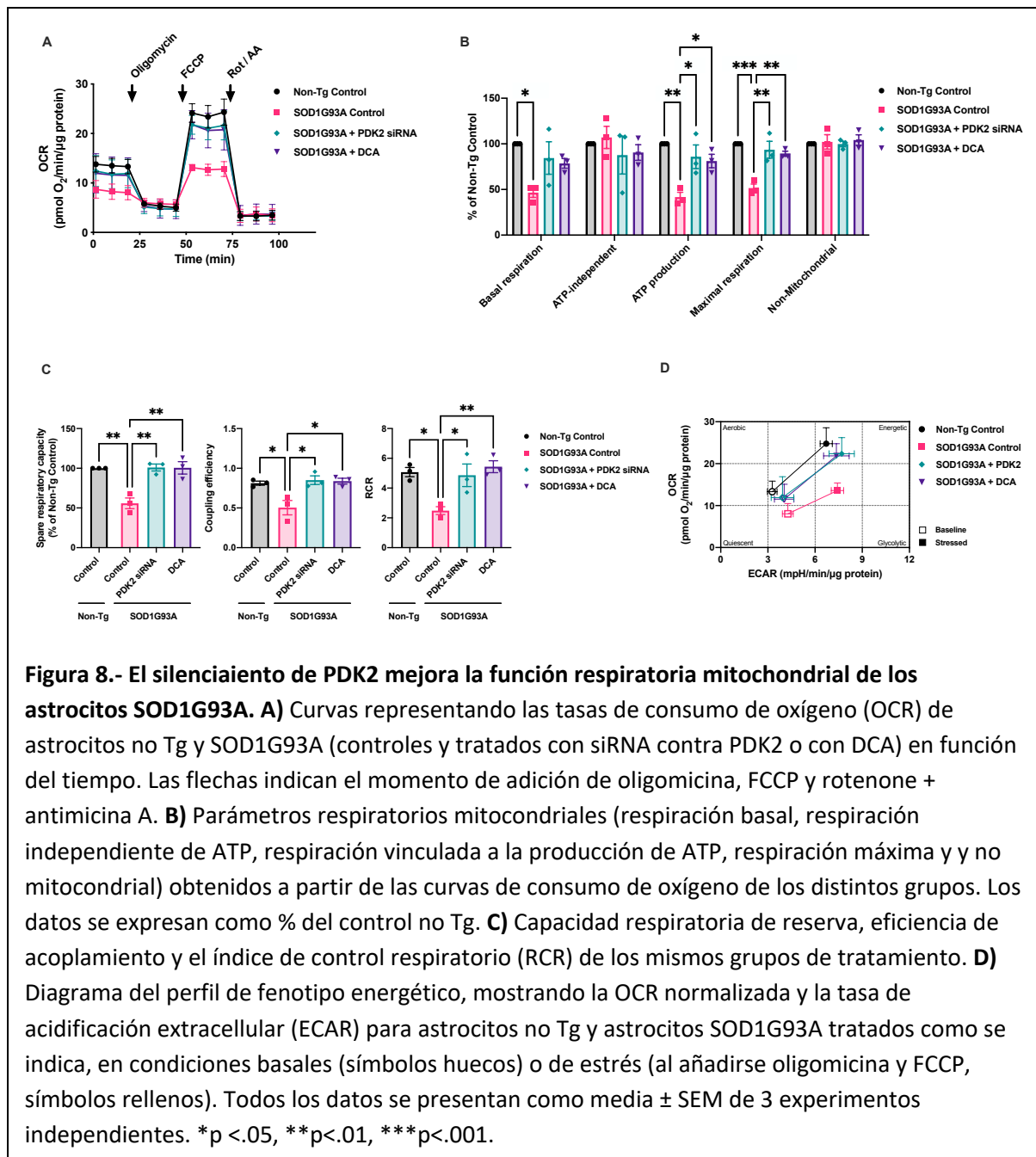
Para estudiar si el silenciamiento de PDK2 puede aumentar la respiración mitocondrial en astrocitos SOD1G93A, monocapas confluentes de astrocitos SOD1G93A y no Tg se incubaron con siRNA para PDK2 o NC siRNA, y se midió el consumo de oxígeno antes y después del agregado secuencial de inhibidores específicos de los complejos respiratorios y desacoplantes de la OXPHOS como se indica en métodos. Como hemos reportado previamente utilizando el oxímetro Oroboros (Miquel et al., 2012), también en este caso utilizando el analizador de flujo extracelular Seahorse, detectamos una capacidad respiratoria disminuida en los astrocitos SOD1G93A comparados con los no Tg. El

silenciamiento del mRNA de PDK2 o el tratamiento con DCA aumentó el consumo de oxígeno en los astrocitos SOD1G93A al nivel que mostraron los no Tg (Figura 8). En estos astrocitos, constatamos una reducción de los parámetros bioenergéticos: respiración basal, respiración vinculada a la producción de ATP y respiración máxima, comparada con los astrocitos no TG (Figura 8B). Estos resultados están en acuerdo con lo reportado para otros tipos celulares que expresan la enzima mutada SOD1G93A (Pharaoh et al., 2019).



**Figura 7.- El tratamiento con siRNA contra PDK2 redujo la expresión del ARNm de PDK2 y la actividad PDK en astrocitos. A)** Niveles relativos de expresión de PDK2 en astrocitos tratados con siRNA contra PDK2, contra PDK1, un siRNA control negativo (NC siRNA), y astrocitos control. Cuantificación por qPCR. **B)** Niveles relativos de PDH fosforilada y PDH total en astrocitos. Panel superior: Western blot representativo utilizando anticuerpos contra PDH fosforilada (PDH Pser293), PDH E1 $\alpha$  total, y  $\alpha$ -tubulin como control de carga, en muestras de astrocitos tratados siRNA contra PDK2, PDK1, NC siRNA, o vehículo. Panel inferior: Cuantificación de la relación PDH fosforilada / PDH total. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  SEM de 4-5 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ .





Con el silenciamiento de PDK2 o el tratamiento con DCA, los astrocitos SOD1G93A aumentaron de manera significativa la respiración asociada a la producción de ATP y la respiración máxima (Figura 8B). No se observaron cambios significativos en la respiración basal en ninguno de los dos tratamientos. Tampoco se encontraron cambios en la respiración no mitocondrial o la respiración independiente de ATP. Además, la capacidad de reserva respiratoria y los índices: Eficiencia de acople y RCR disminuyeron significativamente en los astrocitos SOD1G93A comparados con los no TG. (Figura 8C).

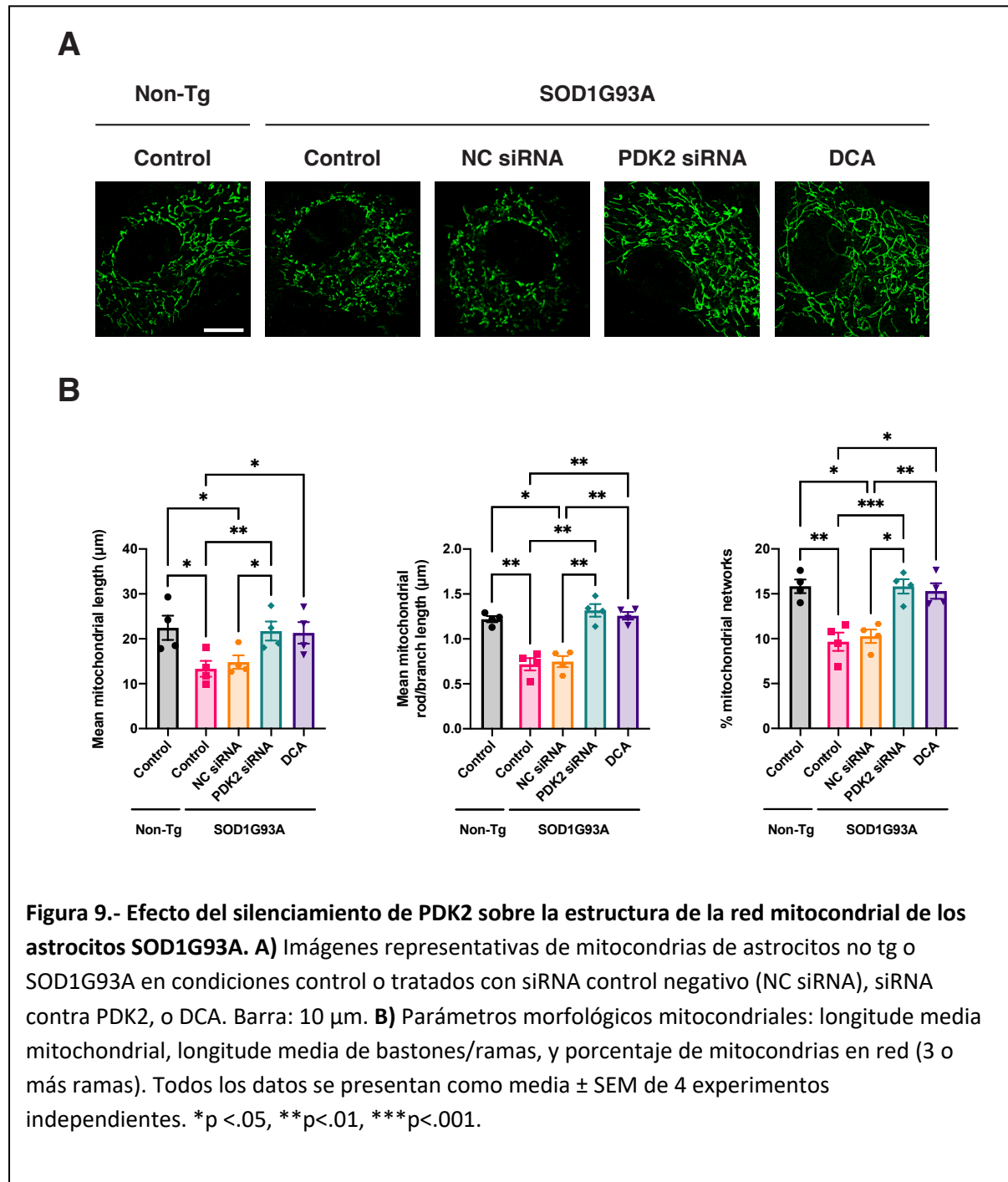
Este comportamiento indica una reducción en la capacidad de la OXPHOS para responder a un aumento en la demanda energética, menor acoplamiento de la misma a la fosforilación del ADP y una disminución global de la función respiratoria mitocondrial, respectivamente (Brand & Nicholls, 2011). Tanto el silenciamiento de PDK2 como el tratamiento con DCA indujeron un aumento de estos índices en los astrocitos SOD1G93A, hasta niveles similares a los de los astrocitos no Tg.

Finalmente, la medida en simultáneo de la OCR y la ECAR en condiciones basales y en situación de estrés (al añadir oligomicina y FCCP), reveló un cambio en el perfil de fenotipo energético de los astrocitos SOD1G93A tras el silenciamiento de PDK2 o el tratamiento con DCA, hacia un fenotipo más energético (Figura 8D), similar al de los astrocitos no Tg. Esto sugiere que los astrocitos SOD1G93A control presentan una función respiratoria mitocondrial globalmente reducida, la cual puede ser modulada con los tratamientos aplicados.

#### *LAS MODIFICACIONES BIOENERGÉTICAS MITOCONDRIALES DESCRITAS SE ACOMPAÑARON DE UNA MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE LA RED MITOCONDRIAL*

La mejora de la función respiratoria mitocondrial en astrocitos SOD1G93A tratados con siRNA contra PDK2 se asoció con cambios morfológicos en la red mitocondrial visualizados con marcado mitocondrial en células vivas con mitotracker green FM y visualización con microscopía confocal (Figura 9). Luego del procesamiento de las imágenes, incluyendo binarización y análisis del esqueleto 3D de los objetos identificados, se reconocieron dos tipos de estructuras mitocondriales: redes (estructuras mitocondriales con al menos tres ramas) y mitocondrias individuales (mitocondrias aisladas, que podrían ser puntuales - un solo píxel en la imagen esqueletizada - o bastones - estructuras no ramificadas con dos o más píxeles en la imagen esqueletizada-) (Figura 6). En los astrocitos SOD1G93A se encontraron mitocondrias individuales pequeñas y redes más fragmentadas en comparación con la morfología filamentosa de la red mitocondrial exhibida por los astrocitos no Tg (Figura 9A). Esta descripción coincide reportes previos sobre células gliales que expresan SOD1G93A (Jiménez-Riani et al., 2017; Joshi et al., 2019; Martínez-Palma et al., 2019). Por el contrario, cuando se trataron los astrocitos SOD1G93A con DCA o siRNA contra PDK2, los astrocitos adquirieron una morfología de red mitocondrial similar a la de los astrocitos no Tg (Figura 9A). En consecuencia, la longitud mitocondrial media (incluidas todas las ramas), así como la longitud media de los bastones/ramas mitocondriales (longitud media de las mitocondrias con morfología de bastón y de las ramas individuales de mitocondrias ramificadas), se redujo significativamente en los astrocitos SOD1G93A en comparación con los no Tg (Figura 9B). Estos parámetros se incrementaron en astrocitos SOD1G93A tratados con siRNA contra PDK2 o con DCA, llegando a niveles similares a los de los

astrocitos no Tg, pero no lo hicieron en el caso de los astrocitos SOD1G93A tratados con NC siRNA (Figura 9B). Además, el porcentaje de las mitocondrias que adoptaron una morfología interconectada, en red, se redujo en astrocitos SOD1G93A (con un mayor porcentaje de mitocondrias aisladas) en comparación con los no Tg, y aumentó significativamente en el caso de las células tratadas con siRNA contra PDK2 o con DCA, a un nivel similar al de los astrocitos no Tg.

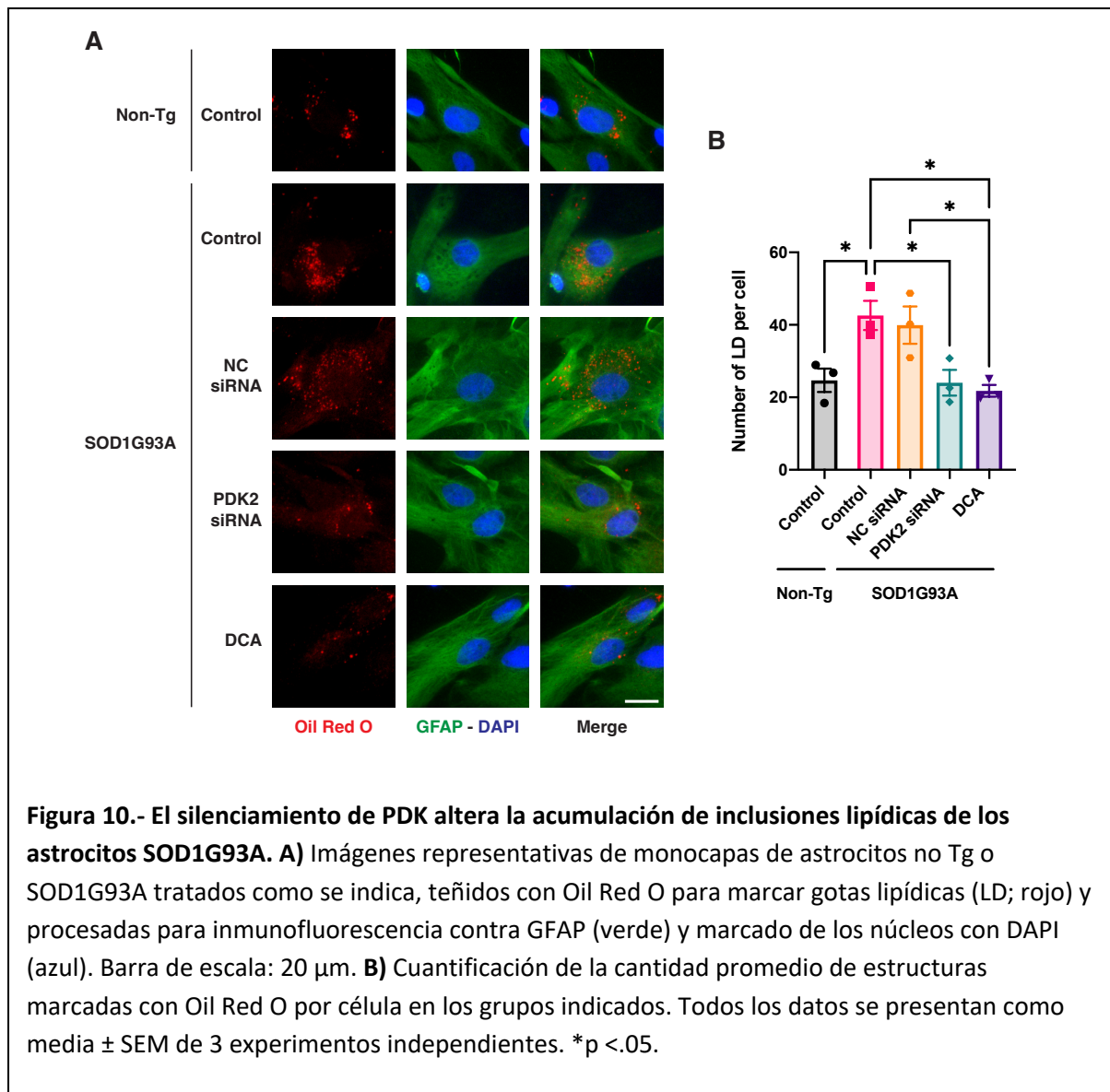


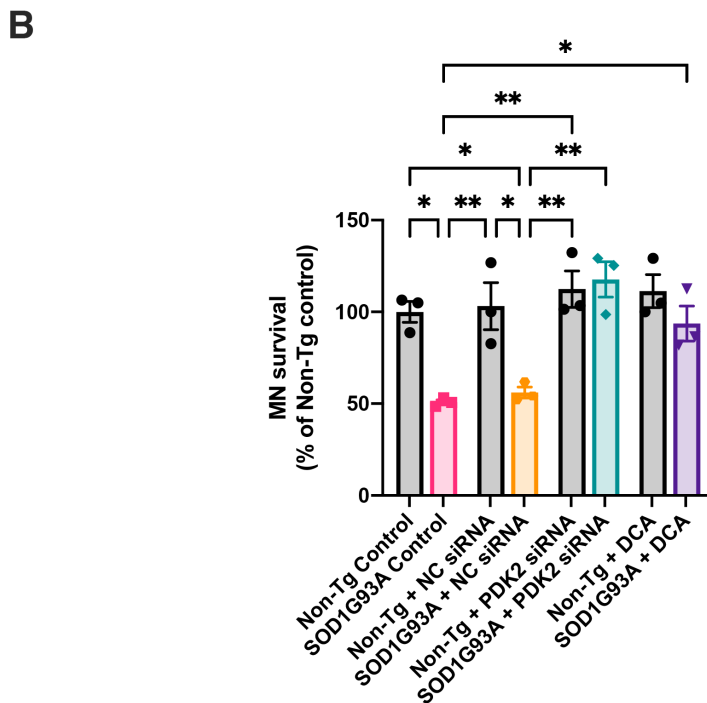
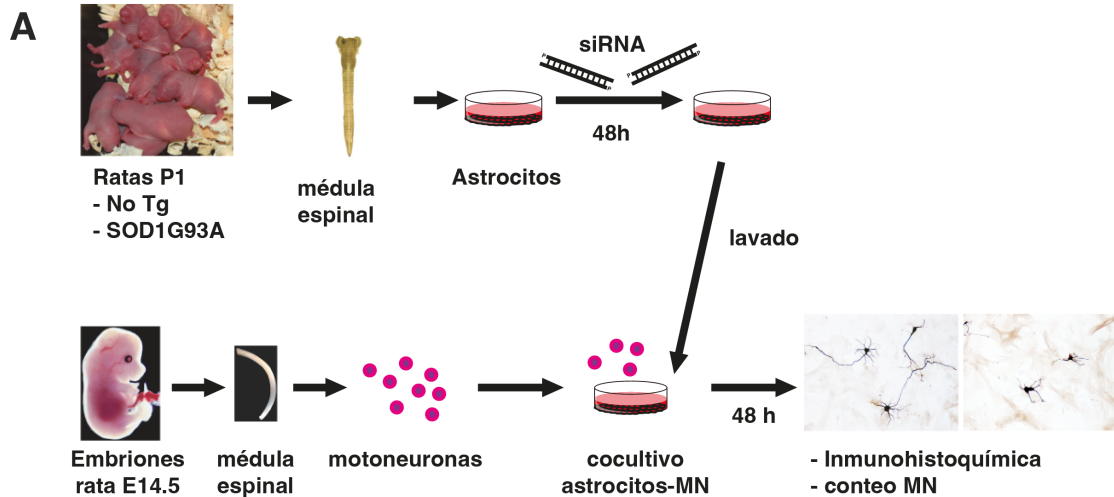
### *EL SILENCIAMIENTO DEL ARNm DE PDK2 REDUJO LA ACUMULACIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS EN ASTROCITOS SOD1G93A*

La inhibición de la respiración mitocondrial ha sido asociada a la acumulación de inclusiones lipídicas en varios tipos celulares (L. Liu et al., 2015), incluidas las células gliales. También se ha descrito que las glías que expresan la proteína SOD1G93A muestran un aumento de las inclusiones lipídicas (Jiménez-Riani et al., 2017). Es por esto que decidimos analizar el silenciamiento de PDK puede afectar estos organelos en los astrocitos SOD1G93A. El examen de los astrocitos teñidos con Oil red O mostró una acumulación citoplásmica de cuerpos redondos de tamaño variable que rodeaban el núcleo celular, una imagen consistente con gotas de lípidos (LD; Figura 10A). Las inclusiones lipídicas presentaron una distribución heterogénea a lo largo de la monocapa de astrocitos. La cuantificación de la cantidad de LD por célula reveló la previamente descrita mayor cantidad de LD en los astrocitos SOD1G93A (Velebit et al., 2020) en relación con los astrocitos no Tg. Sin embargo, aquellos astrocitos SOD1G93A sometidos a silenciamiento de PDK2 o su inhibición farmacológica presentaron una reducción significativa en el número de LD (Figura 10B).

### *EL SILENCIAMIENTO GÉNICO DE PDK2 AUMENTA CAPACIDAD DE ASTROCITOS SOD1G93A PARA SOSTENER LA SUPERVIVENCIA DE MOTONEURONAS.*

A continuación, se evaluó el efecto del silenciamiento de PDK2 sobre la toxicidad de los astrocitos SOD1G93A hacia las motoneuronas. Como fue descrito previamente (Vargas et al., 2006), los astrocitos SOD1G93A exhibieron una capacidad reducida para respaldar la supervivencia de motoneuronas en comparación con los astrocitos no Tg. El número de motoneuronas que sobrevivieron después de 72 h sobre las monocapas de astrocitos SOD1G93A se redujo en aproximadamente un 50 % en comparación con el obtenido en los cocultivos de astrocitos/motoneuronas no Tg (Figura 11). El silenciamiento del ARNm de PDK2 en astrocito SOD1G93A aumentó significativamente la supervivencia de motoneuronas en cocultivo hasta el nivel alcanzado sobre los astrocitos no Tg o los astrocitos SOD1G93A tratados con DCA. No se encontró ningún efecto con siRNA NC (Figura 11).



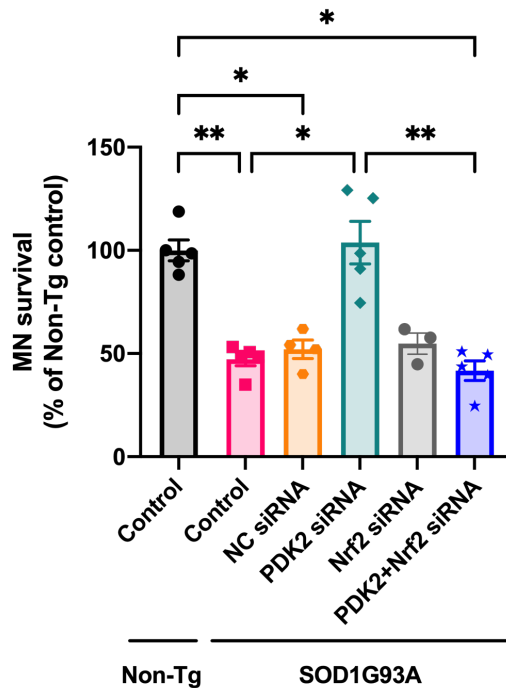


**Figura 11.- El silenciamiento de PDK2 aumenta la capacidad de los atrocitos SOD1G93A para mantener la supervivencia de motoneuronas. A)** Esquema representando el flujo de trabajo para el cocultivo astrocitos – motoenuronas. **B)** Supervivencia de motoneuronas no Tg sobre monocapas de astrocitos no Tg o SOD1G93A luego de su incubación siRNA contra PDK2, siRNA control negativo (NC), o DCA. La supervivencia se expresa como porcentaje de la supervivencia de MN observada sobre astrocitos no Tg (control). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ .

## *EL SILENCIAMIENTO GÉNICO DE NRF2 ANULA LA CAPACIDAD TRÓFICA ADQUIRIDA POR EL SILENCIAMIENTO DE PDK2 EN ASTROCITOS SOD1G93A*

Dado que la inhibición de la expresión de PDK2 aumentó la actividad respiratoria mitocondrial e indujo cambios estructurales en la red mitocondrial de los astrocitos SOD1G93A, y al mismo tiempo inhibió su actividad neurotóxica, buscamos pistas sobre qué mecanismos podrían estar involucrados.

El factor de transcripción Nrf2 cumple un rol importante en el apoyo a la integridad estructural y funcional de las mitocondrias (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015), y su inducción ha demostrado ser neuroprotectora en el modelo de cocultivo astrocito SOD1G93A-motoneurona (Díaz-Amarilla et al., 2016; Vargas et al., 2006). Para analizar el papel de Nrf2 en la recuperación de la supervivencia de motoneuronas sobre los astrocitos SOD1G93A con PDK2 silenciada, se inhibió en simultáneo la expresión de Nrf2 utilizando siRNA, tal como lo hemos realizado en trabajos del laboratorio (ver más adelante). El silenciamiento de Nrf2 eliminó los efectos beneficiosos del siRNA contra PDK2 sobre la capacidad de los astrocitos SOD1G93A para mantener la supervivencia de las motoneuronas (Figura 12).



**Figura 12.- Nrf2 media los efectos beneficiosos sobre la supervivencia de motoneuronas del silenciamiento de PDK2 en astrocitos SOD1G93A.** Supervivencia de motoneuronas no Tg sobre monocapas de astrocitos no Tg o SOD1G93A tratados con siRNA contra PDK2, siRNA contra Nrf2, la combinación de siRNA PDK2+Nrf2, o siRNA control negativo. La supervivencia se expresa como porcentaje de la supervivencia de MN observada sobre astrocitos no Tg (control). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM de 3-5 experimentos independientes. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ .

## DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos que la inhibición de la expresión de PDK2 en astrocitos SOD1G93A es capaz de modular su perfil energético, induciendo un cambio metabólico caracterizado por una mayor actividad respiratoria mitocondrial y una remodelación estructural de la red mitocondrial, adquiriendo características similares a los astrocitos no Tg. El silenciamiento de PDK2 mediado por siRNA mejoró la capacidad de los astrocitos SOD1G93A de mantener la supervivencia de motoneuronas por un mecanismo dependiente de Nrf2. Nuestros resultados refuerzan la hipótesis de que la función mitocondrial en astrocitos es fundamental para el mantenimiento de las neuronas en la ELA.

Las señales proporcionadas por las células que rodean a las motoneuronas en el tejido nervioso son claves para la supervivencia neuronal en la ELA. Nuestro grupo y otros hemos demostrado que los astrocitos y las glías aberrantes SOD1G93A selectivamente inducen la muerte de motoneuronas (Di



Giorgio et al., 2007; Díaz-Amarilla et al., 2011; Nagai et al., 2007; Vargas et al., 2006). Hemos propuesto que detrás de este fenómeno subyace una reprogramación metabólica de los astrocitos SOD1G93A, caracterizada por una actividad respiratoria mitocondrial disminuida, con menor capacidad para responder a cambios en los requerimientos energéticos, y que se encuentra asociada una menor capacidad para soportar la supervivencia de las motoneuronas (Cassina et al., 2021). Esto fue respaldado por los resultados obtenidos al tratar astrocitos SOD1G93A con el modulador metabólico DCA (Miquel et al., 2012). Los astrocitos tratados con DCA presentaron una notoria mejora en los parámetros energéticos mitocondriales y una mayor capacidad para mantener la supervivencia de motoneuronas en cocultivo. Además, la administración oral de DCA a ratones SOD1G93A también mejoró su capacidad respiratoria mitocondrial, al mismo tiempo que extendió su supervivencia, estableciendo a la modulación metabólica como una estrategia promisorio para retrasar la progresión de la enfermedad.

Un blanco fundamental para la modulación metabólica es el PDC, complejo enzimático mitocondrial que vincula la glicólisis con el ciclo de Krebs y por ende, la fosforilación oxidativa (Patel & Roche, 1990; Takubo et al., 2013). El PDC es un gran complejo proteico que contiene 3 subunidades principales con actividad enzimática: PDH, dihidrolipoamida acetiltransferasa, y dihidrolipoil deshidrogenasa (Hiromasa et al., 2004; Hitosugi et al., 2011). La PDH oxida al piruvato (Fan et al., 2014) y presenta residuos regulatorios de serina que funcionan como sitios blanco de fosforilación (Kolobova et al., 2001). El PDC se encuentra así sometido a una fina regulación fosfatasa y por las cuatro isoformas de PDK (PDK1-4) (Jha et al., 2012). El previamente mencionado rol del DCA como un modulador metabólico se basa en su conocida acción como inhibidor de PDK, lo cual ha demostrado tener efectos protectores en modelos de ELA (Martínez-Palma et al., 2019; Miquel et al., 2012; Palamiuc et al., 2015). Otro inhibidor de PDK descrito más recientemente, el fenilbutirato, también ha mostrado efectos promisorios en la ELA (Del Signore et al., 2009; Paganoni et al., 2020; Ryu et al., 2005), e incluso presenta un efecto sinérgico con el DCA (Ferriero et al., 2015). La isoforma 2 de la PDK (PDK2) es una de las de mayor expresión en astrocitos (Halim et al., 2010) y presenta bajos niveles de expresión en neuronas. Las motoneuronas expresan principalmente PDK1 y PDK3, mientras que los astrocitos tienen altos niveles de expresión de PDK2 y PDK4. A pesar de esto, el silenciamiento de PDK2 fue suficiente para inhibir la fosforilación de PDH. Como ha sido reportado previamente, PDK2 es uno de los principales determinantes del estado de actividad de PDH en astrocitos (Rahman et al., 2020). Todo esto abre la posibilidad de en un futuro intentar inhibir la expresión de las isoformas de PDK de mayor expresión en los astrocitos *in vivo* mediante vectores que expresen el ARN interferente. De esa manera se evitarían las consecuencias de la modulación metabólica sistémica y podríamos concentrar los efectos en las células de interés. El tratamiento con siRNA contra PDK2 resultó en una menor expresión

de PDK2 en astrocitos, y notablemente, menores niveles de fosforilación de PDH, con una mayor actividad de fosforilación oxidativa en las células. De hecho, los astrocitos SOD1G93A presentaron un aumento significativo en los parámetros bioenergéticos mitocondriales e índices respiratorios tras el tratamiento con DCA o silenciamiento de PDK2. Estos resultados nos permiten plantear que si bien los astrocitos SOD1G93A presentan una menor capacidad respiratoria mitocondrial, que podría alcanzarse con menor masa mitocondrial o mitocondrias respiratoriamente menos activas, esto no representa una verdadera disfunción irreversible, sino que es posible su reprogramación metabólica.

Además de estimular la función respiratoria mitocondrial, el silenciamiento de PDK2 modificó la morfología de la red mitocondrial de los astrocitos SOD1G93A. Durante la reactividad glial asociada a la ELA, los astrocitos sufren un cambio metabólico hacia un metabolismo más glucolítico, asociado a cambios estructurales en las mitocondrias (Cassina et al., 2021). Las mitocondrias pasan de formar una red interconectada, con mitocondrias elongadas, a tener principalmente mitocondrias pequeñas, redondeadas, con menos ramificaciones, lo cual se ha asociado a una menor actividad respiratoria y descrito en varios tipos celulares (Galloway et al., 2012b; Sauvanet et al., 2010), incluyendo células gliales aberrantes SOD1G93A (Martínez-Palma et al., 2019). La estimulación de la actividad PDH mediante silenciamiento de PDK o tratamiento con DCA revirtió todos estos cambios mitocondriales estructurales además de los funcionales. Los astrocitos SOD1G93A pasaron a tener una menor fragmentación mitocondrial y mayor actividad respiratoria, apoyando que estas características están asociadas. En conjunto, estas descripciones detalladas de la morfología y actividad mitocondrial y cómo están vinculadas entre sí, con la progresión de la enfermedad y su extensión a varios tipos celulares, podrían permitir no sólo la evaluación de posibles tratamientos sino también desarrollar técnicas para la clasificación de pacientes o seguimiento de su evolución.

El cambio metabólico inducido por el silenciamiento de PDK2 condujo a una reducción del contenido de inclusiones lipídicas en los astrocitos SOD1G93A. Las inclusiones lipídicas son organelos cuya presencia está regulada en respuesta a diferentes condiciones, ya sean fisiológicas o patológicas, inclusive la disfunción mitocondrial (Renne & Hariri, 2021). La actividad respiratoria mitocondrial provee de ATP y NADPH que sirven de soporte para la síntesis de ácidos grasos y precursores para su esterificación a triacilgliceroles en el retículo endoplásmico y su almacenamiento en gotas lipídicas (Smolič, Zorec, et al., 2021). El número de gotas lipídicas aumenta en astrocitos en condiciones de hipoxia (Smolič, Tavčar, et al., 2021) o en presencia de elevados niveles de especies reactivas del oxígeno (A. Islam et al., 2019). De hecho, los astrocitos SOD1G93A presentan una elevada producción de EROs (Vargas et al., 2006) y las células gliales aberrantes SOD1G93A también presentan acumulación de inclusiones lipídicas, evidenciadas por microscopía electrónica (Jiménez-Riani et al.,

2017). El análisis lipidómico de la médula espinal de ratones SOD1G93A evidenció una particular acumulación de lípidos, en particular ésteres de colesterol y ceramidas, con alteraciones asociadas a la progresión de la enfermedad, y una reducción en los niveles de cardiolipina, reflejo de alteraciones mitocondriales (Chaves-Filho et al., 2019). El secuestro de distintos lípidos en las gotas lipídicas podría representar un mecanismo protector contra el estrés oxidativo y la lipotoxicidad, para evitar los efectos de la peroxidación de lípidos de membrana (Bailey et al., 2015; Olzmann & Carvalho, 2019). Nuestra observación de que en los astrocitos SOD1G93A se observa una reducción de las gotas lipídicas junto a un aumento en la actividad respiratoria mitocondrial luego de la inhibición de la actividad PDK, apoyan la idea de que en las células está ocurriendo una reprogramación metabólica.

Uno de los principales hallazgos de este trabajo es que el silenciamiento de PDK2 en los astrocitos SOD1G93A incrementó su capacidad para mantener la supervivencia de motoneuronas, restaurándola a niveles similares a la de los astrocitos no Tg. Aún no hemos dilucidado el mecanismo concreto que vincula entre la actividad mitocondrial y el cambio fenotípico del astrocito que conduce a la muerte neuronal, pero múltiples aproximaciones que apuntan a mejorar el estado funcional de la mitocondria conducen al mismo efecto. Esto lo hemos demostrado tanto con la estimulación directa de la actividad PDH (como en este trabajo centrado en PDK2 y nuestros trabajos previos utilizando DCA (Martínez-Palma et al., 2019; Miquel et al., 2012)), o previniendo el daño a proteínas mitocondriales utilizando antioxidantes. Nuestro grupo ha demostrado previamente que distintos antioxidantes e inhibidores de la óxido nítrico sintasa son capaces de incrementar la actividad respiratoria mitocondrial de los astrocitos SOD1G93A y restaurar su capacidad trófica hacia motoneuronas (Cassina et al., 2008). Nrf2 es el principal regulador transcripcional de la respuesta antioxidante celular, uniéndose a los elementos ARE (de *antioxidant response element*) en las regiones reguladoras de los genes blanco. En condiciones normales, Nrf2 se encuentra unido a la proteína *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1), la cual promueve su degradación por la vía de ubiquitina-proteasoma (Kansanen et al., 2013). En condiciones de estrés oxidativo, la interacción entre Nrf2 y Keap1 se rompe, permitiendo que Nrf2 se acumule en el núcleo donde activa la transcripción de genes que contengan una secuencia ARE en sus promotores, induciendo la respuesta antioxidante (Kensler et al., 2007). Y una adecuada respuesta antioxidante es esencial para mantener la capacidad trófica de los astrocitos hacia las neuronas (Díaz-Amarilla et al., 2016; Vargas et al., 2006). En nuestro trabajo, el aumento de la capacidad trófica de los astrocitos SOD1G93A inducido por el silenciamiento de PDK2 se perdió cuando al mismo tiempo se silenció Nrf2. Esto refuerza la idea de que la señalización por Nrf2 es necesaria para la protección neuronal mediada por astrocitos, y amerita una exploración mecanística más profunda. En relación a esto, existen datos de que el DCA sería capaz de estimular las defensas antioxidantes en el hígado de ratones (Hassoun & Cearfoss, 2011), y recientemente se ha reportado una interacción entre DCA y

Nrf2 en un modelo de isquemia-reperfusión, donde el tratamiento con DCA previno el daño oxidativo por un mecanismo dependiente de la activación de Nrf2 (Zhao et al., 2021).

Resulta interesante que la función respiratoria mitocondrial disminuida de los astrocitos SOD1G93A puede ser aumentada con la inhibición de la actividad de PDK, tanto en este estudio como en nuestros trabajos previos, lo cual sugiere que no se trata de un daño irreversible sino de una adaptación metabólica a un microambiente neurodegenerativo, un concepto que en los últimos años ha ganado aceptación (Bellissimo et al., 2022; Cassina et al., 2021). De forma similar, la actividad mitocondrial disminuida y gran capacidad proliferativa de las células gliales aberrantes SOD1G93A se vio revertida por el tratamiento con DCA (Martínez-Palma et al., 2019). Una asociación entre la capacidad respiratoria mitocondrial y la habilidad de la glía de mantener la supervivencia de motoneuronas se repite en estos distintos trabajos (Cassina et al., 2021).

Nuestros resultados refuerzan la idea de que una correcta función mitocondrial de los astrocitos es fundamental para mantener la supervivencia neuronal, y sugieren que una reprogramación metabólica específica de tipo celular podría ser un blanco promisorio para modular la toxicidad mediada por astrocitos en la ELA.

## CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos que la inhibición de la expresión de una isoforma de PDK usualmente de alta expresión en astrocitos (PDK2) es capaz de modular el perfil energético de los astrocitos, induciendo un cambio metabólico caracterizado por una mayor actividad respiratoria mitocondrial y una remodelación de la red mitocondrial, adquiriendo características similares a las de los astrocitos no Tg. Esta inhibición de la expresión de PDK2 fue suficiente para que los astrocitos SOD1G93A adquirieran la capacidad de mantener la supervivencia de motoneuronas en forma similar a los astrocitos no Tg, por un mecanismo en el cual parece participar el factor de transcripción Nrf2. Estos resultados refuerzan la teoría de que la función mitocondrial en los astrocitos es fundamental para el mantenimiento de las neuronas en la ELA. Además, aportan datos de factibilidad para extender estos estudios en organismos enteros.

Los resultados obtenidos en esta etapa del trabajo de tesis de doctorado resultaron en la generación de un manuscrito que en este momento se encuentra en revisión en la revista GLIA. El documento enviado se adjunta al final de este capítulo:

Miquel, E., Villarino, R., Martínez-Palma, L., Cassina, A., Cassina, P. (2022). Pyruvate dehydrogenase kinase 2 knockdown restores the ability of ALS-linked SOD1G93A rat astrocytes to support motor neuron survival by increasing mitochondrial respiration. *GLIA* (*en revisión*).

## MANUSCRITO CAPÍTULO 2

Pyruvate dehydrogenase kinase 2 knockdown restores the ability of ALS-linked SOD1G93A rat astrocytes to support motor neuron survival by increasing mitochondrial respiration. Miquel, E., Villarino, R., Martínez-Palma, L., Cassina, A., Cassina, P. (2022). *GLIA* (en revisión).



patricia cassina &lt;patricia.cassina@gmail.com&gt;

---

**Manuscript Received - GLIA-00233-2022**

---

**Kass Klemz** <onbehalf@manuscriptcentral.com>

6 de julio de 2022, 19:31

Responder a: glianorthamerica@gmail.com

Para: pcassina@fmed.edu.uy

Cc: miquel@fmed.edu.uy, rosalia.villarino.m@gmail.com, lmartinezpalma@fmed.edu.uy, adrianamariacassina@gmail.com, pcassina@fmed.edu.uy

06-Jul-2022

Dear Dr. Cassina:

Your manuscript entitled "Pyruvate dehydrogenase kinase 2 knockdown restores the ability of ALS-linked SOD1G93A rat astrocytes to support motor neuron survival by increasing mitochondrial respiration" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in GLIA.

Your manuscript ID is GLIA-00233-2022. Please mention this manuscript ID in all future correspondence or when calling either of the Glia editorial offices:

For submissions to the North American office, direct questions to: Kass Klemz; Tel: 206 543-2340; Email: [glianorthamerica@gmail.com](mailto:glianorthamerica@gmail.com)

For submissions to the European office, direct questions to: Birgit Jarchow; Tel: 49-30-9406-3325; Email: [jarchow@mdc-berlin.de](mailto:jarchow@mdc-berlin.de)

This journal offers a number of license options, information about this is available here: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/index.html>. All co-authors are required to confirm that they have the necessary rights to grant in the submission, including in light of each co-author's funder policies. For example, if you or one of your co-authors received funding from a member of Coalition S, you may need to check which licenses you are able to sign.

Thank you for submitting your manuscript to GLIA.

Sincerely,

GLIA Editorial Office



**Pyruvate dehydrogenase kinase 2 knockdown restores the ability of ALS-linked SOD1G93A rat astrocytes to support motor neuron survival by increasing mitochondrial respiration**

Journal:	GLIA
Manuscript ID	GLIA-00233-2022
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	06-Jul-2022
Complete List of Authors:	Miquel, Ernesto; Universidad de la República Facultad de Medicina, Departamento de Histología y Embriología Villarino, Rosalía; Universidad de la República Facultad de Medicina, Departamento de Histología y Embriología Martínez-Palma, Laura; Universidad de la República Facultad de Medicina, Departamento de Histología y Embriología Cassina, Adriana; Universidad de la República Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica; Universidad de la República Facultad de Medicina, Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO) Cassina, Patricia; Universidad de la República Facultad de Medicina, Departamento de Histología y Embriología
Topics:	Astrocytes, Neurodegenerative diseases, Metabolic interactions with neurons
Techniques:	Immunocytochemistry, Cell culture techniques, PCR, Reducing gene expression in the brain via antisense methods, Analysis of brain metabolism
Key Words:	PKD2, Astrocytes, Mitochondria, ALS

SCHOLARONE™  
Manuscripts



## Title page:

# Pyruvate dehydrogenase kinase 2 knockdown restores the ability of ALS-linked SOD1G93A rat astrocytes to support motor neuron survival by increasing mitochondrial respiration

- 1) Ernesto Miquel: miquel@fmed.edu.uy / ernestomiquel@gmail.com  
Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Av. Gral. Flores 2125. 11800, Montevideo, Uruguay
- 2) Rosalía Villarino: rosalia.villarino.m@gmail.com  
Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Av. Gral. Flores 2125. 11800, Montevideo, Uruguay
- 3) Laura Martínez-Palma: lmartinezpalma07@gmail.com  
Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Av. Gral. Flores 2125. 11800, Montevideo, Uruguay
- 4) Adriana María Cassina: adrianamariacassina@gmail.com  
Departamento de Bioquímica, Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República. Av. Gral. Flores 2125. 11800, Montevideo, Uruguay
- 5) María Patricia Cassina, pcassina@fmed.edu.uy / patricia.cassina@gmail.com  
Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Av. Gral. Flores 2125. 11800, Montevideo, Uruguay

**FUNDING:** This work was supported by Grant # FCE\_1\_2019\_1\_156461 from the Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII), Uruguay to PC and Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA, MEC-UdelaR to PC and EM.

**ETHICS STATEMENT:** Procedures using laboratory animals were in accordance with international guidelines and were approved by the Institutional Animal Committee: Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (CHEA; <https://chea.edu.uy/>); protocol # 1038.

**DATA AVAILABILITY:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**CONFLICT OF INTEREST:** The authors declare that they have no conflict of interest.

# Pyruvate dehydrogenase kinase 2 knockdown restores the ability of ALS-linked SOD1G93A rat astrocytes to support motor neuron survival by increasing mitochondrial respiration

**Running title:** PDK knockdown and ALS astrocyte toxicity

Ernesto Miquel<sup>1</sup>, Rosalía Villarino<sup>1</sup>, Laura Martínez-Palma<sup>1</sup>, Adriana María Cassina<sup>2</sup>, María Patricia Cassina<sup>1</sup>

- 1) Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Av. Gral. Flores 2125. 11800, Montevideo, Uruguay
- 2) Departamento de Bioquímica, Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República. Av. Gral. Flores 2125. 11800, Montevideo, Uruguay

## Acknowledgments:

This work was supported by Grant # FCE\_1\_2019\_1\_156461 from the Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII), Uruguay to PC and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA, MEC-UdelaR to PC and EM. We thank Dr. Homero Rubbo (Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay) for critical comments on the manuscript.

## Word count:

Total word count of the manuscript: 8159 words

Abstract: 249 words

Introduction: 603 words

Materials and Methods: 2239 words

Results: 1119 words

Discussion: 1376 words

Acknowledgments: 53 words

References: 1996 words

Figure Legends: 524 words

## Abstract:

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is characterized by progressive motor neuron degeneration. Various studies using cellular and animal models of ALS indicate that there is a complex interplay between motor neurons and neighboring non-neuronal cells, such as astrocytes, resulting in non-cell autonomous neurodegeneration. Astrocytes in ALS exhibit a lower ability

to support motor neuron survival than non-disease-associated ones, which is strongly correlated with low mitochondrial respiratory activity. Indeed, pharmacological inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) led to an increase in the mitochondrial oxidative phosphorylation pathway as the primary source of cell energy in SOD1G93A astrocytes and restored the survival of motor neurons. Among the four PDK isoforms, PDK2 is ubiquitously expressed in astrocytes and presents low expression levels in neurons. Herein we hypothesize whether selective knockdown of PDK2 in astrocytes may increase mitochondrial activity and, in turn, reduce SOD1G93A-associated toxicity. To assess this, cultured neonatal SOD1G93A rat astrocytes were incubated with specific PDK2 siRNA. This treatment resulted in a reduction of the enzyme expression with a concomitant decrease in the phosphorylation rate of the PDH complex. In addition, PDK2-silenced SOD1G93A astrocytes exhibited restored mitochondrial bioenergetics parameters, adopting a more complex mitochondrial network. This treatment also decreased lipid droplet accumulation in SOD1G93A astrocytes, suggesting a switch in energetic metabolism. Significantly, PDK2 knockdown increased the ability of SOD1G93A astrocytes to support motor neuron survival through a mechanism dependent on the antioxidant transcriptional regulator Nrf2. These results suggest that PDK2 silencing could be a cell-specific therapeutic tool to slow the progression of ALS.

**Keywords:** PDK2, astrocytes, mitochondria, ALS

### Main Points:

Silencing PDK2 in SOD1G93A astrocytes reduces PDH phosphorylation.

Silenced astrocytes recover mitochondrial bioenergetics and morphology.

This metabolic reprogramming restores the ability of astrocytes to support motor neuron survival.

### Introduction:

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease characterized by the gradual loss of motor neurons (MNs) in the spinal cord, brain stem, and motor cortex, which in turn induce voluntary muscle atrophy (Al-Chalabi et al., 2016). The cellular mechanisms determining neuronal death are still under research, and many have been proposed, including mitochondrial dysfunction (Smith, Shaw, & De Vos, 2019). In ALS patients and animal models of the disease, reactive astrocytes surround both upper and lower degenerating MNs, and evidence indicates that they play a crucial role in the pathology (Taylor, Brown, & Cleveland, 2016). Successive studies have shown that surrounding glial cells, particularly astrocytes, critically influence MN survival (Clement et al., 2003). Co-culture assays have clearly stated a reduced ability of astrocytes to support motor neuron survival in ALS models, whether the cells originate from embryonic stem cells (Di Giorgio, Carrasco, Siao, Maniatis, & Eggan, 2007), human iPSCs (Haidet-Phillips et al., 2011), mice (Nagai et al., 2007) or rat cells (Vargas, Pehar, Cassina, Beckman, & Barbeito, 2006). We have previously described that a metabolic switch characterized by reduced mitochondrial respiration underlies the

astrocyte-mediated toxicity to MNs (Miquel et al., 2012). In primary astrocyte cultures obtained from the transgenic (Tg) ALS-linked mutated SOD1G93A rats (SOD1G93A astrocytes), treatment with the metabolic modulator dichloroacetate (DCA) enhanced both their mitochondrial respiratory activity and ability to support motor neuron survival in co-culture. In addition, DCA administration to SOD1G93A mice reduced neuronal death and increased survival (Miquel et al., 2012). DCA is an inhibitor of the pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs), which phosphorylate the E1 $\alpha$  subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex (PDC) and suppress the catalysis of pyruvate to acetyl-CoA (Holness, Bulmer, Smith, & Sugden, 2003). Inhibition of PDK keeps most of PDH in the active form, and therefore pyruvate metabolism switches towards glucose oxidation to CO<sub>2</sub> in the mitochondria. The PDH/PDK system acts as a key regulator of mitochondrial respiration. It plays an essential role in the metabolic switch from oxidative phosphorylation (OXPHOS) to aerobic glycolysis that accompanies malignant transformation in cancer (Zhang, Zhang, Hu, & Tam, 2015).

The reversible phosphorylation of PDH-E1 $\alpha$  that regulates PDC activity (Patel & Korotchkina, 2006) is accomplished by four different PDKs (PDK1-4) and two different phosphatases (PDP1-2), which are all differentially expressed in mammalian tissues (Bowker-Kinley, Davis, Wu, Harris, & Popov, 1998). The regulation of PDC at the protein expression or activity levels contributes to the differential metabolic phenotype of neurons and astrocytes (Halim et al., 2010). Although PDC is regulated by several mechanisms, including allosteric inhibition by acetyl CoA and NADH, covalent modification of PDC is central for the long-term regulation of metabolic processes. It has been demonstrated that all subunits of PDC are expressed in cultured astrocytes and neurons, but astrocytes express significantly higher immunoreactivities for all subunits than neurons (Halim et al., 2010). In addition, there are different expression levels of PDH kinases and phosphatases between both cell types, with higher expression of PDK2 and PDK4 in astrocytes compared to neurons. Control of PDK expression levels allows cells and tissues to regulate PDC activity and, therefore, glucose oxidation rates and mitochondrial respiration (Lydell et al., 2002). Higher expression of PDK2 and PDK4 in astrocytes is consistent with the higher PDH $\alpha$  phosphorylation status, lower PDC activity and higher lactate production displayed by these cells (Pellerin & Magistretti, 2012). Thus, the different profile of PDK isoforms expression between astrocytes and neurons offers a key target to regulate mitochondrial respiration in astrocytes.

Here we tested the hypothesis whether silencing PDK2 may enhance mitochondrial respiratory function in SOD1G93A expressing astrocytes and, in turn, improve their capacity to support MN survival.

## Materials and Methods

### Materials

Culture media and serum were from Gibco (Thermo Fisher Scientific). Culture flasks and plates were from Nunc (Thermo Fisher Scientific). siRNAs were purchased from Ambion (Thermo Fisher Scientific). DCA and all other reagents were from Sigma-Aldrich (Merck) unless otherwise specified.

### Ethics Statement

Procedures using laboratory animals were in accordance with international guidelines and were approved by the Institutional Animal Committee: Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (CHEA; <https://chea.edu.uy/>); protocol # 1038.

### Animals

Rats (*Rattus norvegicus*) were housed (up to 6 female or male animals per cage) in a centralized animal facility with a 12-h light-dark cycle with ad libitum access to food and water. Male hemizygous NTac:SD-Tg(SOD1G93A)L26H rats (RRID:IMSR\_TAC:2148), obtained from Taconic (Hudson, NY), were bred locally with outbred Sprague–Dawley background. The progenies were genotyped by polymerase chain reaction (PCR), as previously described (Howland et al., 2002).

### Primary Cell Cultures

Neonatal rat astrocyte cultures were prepared from Tg SOD1G93A or non-Tg 1-day-old pups (without regard to sex) genotyped by PCR, according to the procedures of Saneto and De Vellis (Saneto & De Vellis, 1987) with minor modifications (Cassina et al., 2002). Briefly, spinal cords were dissected, meninges were carefully removed, and tissue was chopped and dissociated with 0.25% trypsin-EDTA for 25 min at 37 °C. Trypsinization was stopped with high-glucose (4.5 g/l), pyruvate-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with HEPES (3.6 g/l), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 mg/mL), and 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (s-DMEM medium) in the presence of 50 µg/mL DNase I. After mechanical disaggregation by repeated pipetting, the suspension was passed through an 80-µm mesh and spun for 10 min at 300×g. The pellet was resuspended in s-DMEM medium and plated at a density of  $1.5 \times 10^6$  cells per 25-cm<sup>2</sup> tissue culture flask. When confluent, cultures were shaken for 48 h at 250 rpm, incubated for another 48 h with 10 µM cytosine arabinoside, and then plated at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in 4-well plates for co-cultures, Seahorse xFE24 plates for respirometry assays, or Lab-Tek 4-well chambered coverglass for mitochondrial or lipid droplets imaging studies.

Astrocyte-MN co-cultures: MN preparations were obtained from embryonic day 15 (E15) rat spinal cord by a combination of optiprep (1:10, SIGMA St. Louis, MO) gradient centrifugation and immunopanning with the monoclonal antibody IgG192 against p75 neurotrophin receptor as previously described (Cassina et al., 2002), then plated on rat astrocyte monolayers at a density of 300 cells/cm<sup>2</sup> and maintained for 48 h in Leibovitz's L-15 medium supplemented with 0.63 mg/mL bicarbonate, 5 µg/mL insulin, 0.1 mg/mL conalbumin, 0.1 mM putrescine, 30 nM sodium selenite, 20 nM progesterone, 20 mM glucose, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2% horse serum (HS) (s-L15 medium) as described (Cassina et al., 2002). Astrocyte treatments were done 24 h prior to MNs addition, and the astrocyte monolayers were washed twice with PBS to remove traces of the different treatments before plating the MNs.

### siRNA transfection

80% confluent spinal cord astrocyte monolayers were changed to Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2% fetal bovine serum before treatment. siRNA transfection was

performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Astrocytes were transfected with 40 nM of Silencer Select pre-designed siRNAs (Ambion) targeting PDK2 mRNA, PDK1 mRNA, or negative control siRNA (NC siRNA no. 1) 24 h before either total RNA isolation using TRIzol reagent (Invitrogen) for quantitative PCR or 48h before lysis for western blot or before co-culture experiments. Three different siRNA for PDK2 were tested, and the sequence which achieved a more pronounced reduction of PDK2 expression was selected for the rest of the studies.

### Western Blot

Astrocyte monolayers were treated with siRNA as described above or 5 mM DCA. After 48 h of treatment, proteins were extracted from cells in 1% SDS supplemented with 2 mM sodium orthovanadate and Complete protease inhibitor cocktail (Roche). Lysates were resolved by electrophoresis on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred to a nitrocellulose membrane (Thermo). The membrane was blocked for 1 h at room temperature (RT) in 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS-T (Phosphate-buffered saline with 0.1% Tween). The membrane was then probed overnight with primary antibodies in 5% BSA in PBS-T at 4 °C, washed in PBS-T, and then probed with the appropriate secondary antibodies for 60 min at RT. Primary antibodies were rabbit polyclonal phosphodetect anti- PDH-E1a(pSer293) (AP1062; Calbiochem; RRID:AB\_10616069; 1:800), mouse anti Pyruvate Dehydrogenase E1-alpha subunit (Abcam Cat# ab110334, RRID:AB\_10866116; 1:800), and mouse anti  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich Cat# A5441, RRID:AB\_476744; 1:4000) as loading control. The secondary antibodies used were IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG antibody (LI-COR Biosciences Cat# 926-32210, RRID:AB\_621842) and IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG antibody (LI-COR Biosciences Cat# 925-68071, RRID:AB\_2721181). Detection and quantification were performed with a LI-COR Odyssey imaging system and included software. The relative levels of pSer293 E1a PDH and total E1a PDH were quantified. The pSer293 to total E1a ratio was calculated and normalized against vehicle-treated cells.

### qPCR

Total astrocyte RNA was isolated using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific), followed by chloroform extraction and isopropanol precipitation. Possible DNA contaminations were eliminated with DNase treatment using DNase free Kit (Thermo Fisher Scientific). RNA quality was evaluated by agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining and quantified using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific; RRID:SCR\_016517). 500 ng of this total RNA was reverse-transcribed using 200 U M-MLV-reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) following manufacturer instructions. 25 ng of the resulting cDNA was diluted in Biotools Quantimix Easy master mix (Biotools) in 10  $\mu$ l volume. All reactions were performed in triplicates in strip tubes (Axygen), using specific forward and reverse primers. The sequences of the quantitative PCR primers (IDT, Integrated DNA Technologies) used were as follows: for GAPDH F: 5'-CAC TGA GCA TCT CCC TCA CAA-3' and R: 5'-TGG TAT TCG AGA GAA GGG AGG-3', for PDK2 F: 5'- TCA GCT AGG GGC CTT CTC TT-3' and R: 5'- CCG TAC CCC AGG GGA TAG AT-3'. According to the sample, we used cycles 15–23 (the threshold cycle, Ct) to calculate the relative amounts of our gene of interest. PCR amplification was done over 40 cycles using a Rotor-Gene 6000 System (Corbett Life Science), and data were analyzed using Rotor-Gene 6000 software (Corbett Life Science);

RRID:SCR\_017552). Quantification was performed with  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method using astrocytes treated with vehicle as a negative control and GAPDH mRNA as reference.

### Oxygen consumption rate assays

Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were measured simultaneously in a Seahorse XFe24 extracellular flux analyzer (Agilent; RRID:SCR\_019539). Before the experiment, the culture medium was replaced with an unbuffered medium (DMEM pH 7.4, supplemented with 5 mM glucose, 1 mM sodium pyruvate, 32 mM NaCl, and 2 mM glutamine) and incubated for 1 h at 37 °C without CO<sub>2</sub>. Basal oxygen consumption measurements were taken at the beginning of the assay, followed by the sequential addition of oligomycin (0.5 μM), carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP; 2 μM), and antimycin A (AA; 1 μM) + rotenone (1 μM). The following bioenergetics parameters were determined: Basal respiration: (last OCR measurement before oligomycin injection) - (minimum OCR after rotenone/antimycin A addition); ATP-independent respiration: (oligomycin-resistant respiration) - (minimum OCR after rotenone/antimycin A addition); Respiration linked to ATP production: (last OCR measurement before oligomycin injection) - (minimum OCR after oligomycin addition); Maximal respiration: (maximum OCR after FCCP addition) - (minimum OCR after rotenone/antimycin A addition); Spare respiratory capacity: Maximal respiration - Basal respiration. After each assay, protein content (μg) per well was determined with the bicinchoninic acid (BCA) technique. OCRs and ECARs were normalized considering protein content (μg). Respiratory Indexes were determined as ratios between the respiratory rates obtained in different conditions, which are therefore internally normalized and independent of cell number or protein mass (Brand & Nicholls, 2011). These include Coupling efficiency (ratio between respiration linked to ATP synthesis and basal respiration) and Respiratory Control Ratio (RCR; the ratio between maximum and oligomycin-resistant respiration rates).

### Fluorescent Labeling of Mitochondria

Confluent astrocyte monolayers seeded on 4-well Nunc™ Lab-Tek™ chambered coverglass (Thermo Scientific) were treated as indicated above with vehicle, NC siRNA, PDK2 siRNA, or 5 mM DCA. After 48 h, the cells were incubated with 100 nM MitoTracker Green FM (Thermo/Invitrogen, Cat# M7514) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) for 30 min in a 37 °C incubator at 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. Following incubation, cells were washed in warm DMEM and visualized by confocal microscopy. Confocal image stacks were acquired with a Leica TCS-SP5-II confocal microscope (Leica Microsystems) using an HCX PL APO 63x/1.40 oil immersion objective, with 0.2 μm z-stack slice intervals and at least 10 slices per cell. Images were obtained for at least 25 cells per group from 4 independent experiments.

### Mitochondrial morphology analysis

Confocal image stacks were deconvolved with Huygens Professional version 19.10 (Scientific Volume Imaging, The Netherlands). Mitochondrial morphology was analyzed using Fiji (ImageJ) software (NIH; RRID:SCR\_002285) as follows: Image stacks corresponding to individual cells were extracted from each confocal stack. Images were converted to binary by thresholding and processed to remove noise and outlier voxels. Mitochondrial skeleton profiles were obtained with the built-in Skeletonize feature, and morphology was analyzed with the skeleton



analysis plugin, which measures the length of each branch and the number of branches in each skeletonized feature, from which parameters describing mitochondrial network morphology were calculated. Distinct mitochondrial morphologies were identified and classified as individuals (puncta and rods) or networks as previously reported (Leonard et al., 2015; Valente, Maddalena, Robb, Moradi, & Stuart, 2017): punctate mitochondria are defined as small point-like structures, whereas rods are elongated without being branched. Networks are characterized by connected branches. In the skeleton analysis, individuals (puncta or rods) have no junctions, while networks are structures with at least one junction. We quantified the number of 'individual' structures with no branches (puncta and rods), the number of networks, mean mitochondrial length, and mean length of rods/network branches (mean rod/branch length). For this last parameter, we considered rods and network branches together (puncta are not included), as the biological forces increasing rod length and those increasing the length of network branches should essentially be the same (Valente et al., 2017). Data from at least 25 cells per treatment were analyzed and repeated in four independent experiments.

### Lipid droplets labeling and quantification

Subconfluent astrocyte monolayers seeded on 4-well Nunc™ Lab-Tek™ chamber slides (Thermo Scientific) were treated as indicated above with vehicle, NC siRNA, PDK2 siRNA, or 5 mM DCA in DMEM with 2% Foetal Bovine Serum. 48 h later, cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 18 min on ice, and washed twice with PBS. Then, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 30 min followed by incubation with blocking solution (BS): 10 % goat serum, 2% bovine serum albumin, 0,1% triton X-100 in PBS for 1 h at RT. Cells were incubated overnight with rabbit anti glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (1:500; Sigma-Aldrich #G9269, RRID:AB\_477035) in BS at RT, followed by washing three times in PBS and incubation with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:1000, Thermo Fisher Scientific, # A-11034, RRID:AB\_2576217) for 1 h at RT. After washing twice with PBS, cells were incubated for 30 min at RT with Oil Red O (ORO) working solution (ORO stock solution: 0.625% ORO in 99% (vol/vol) isopropyl alcohol prepared by stirring for 2 h at RT; ORO working solution: 1.5 parts of ORO stock solution to one part of distilled water, incubated for 10 min at 4 °C, and filtered through a 45-µm filter to remove precipitates). Following incubation, cells were washed thrice with deionized water, incubated with Hoechst 33342 (1 µg/mL; Sigma-Aldrich #14533) for 15 min at RT to label nuclei, and mounted in 80% glycerol in PBS. Cell images were acquired using a Nikon Eclipse E400 epifluorescence microscope (Nikon) coupled with a Nikon Ds-Fi3 camera, using a 40x objective. At least 25 images were obtained per group from 3 independent experiments. Lipid Droplet (LD) quantification: LD images were binarized by thresholding using Fiji (ImageJ) software (NIH; RRID:SCR\_002285), and particles present in each image were counted and analyzed using the "Analyze particles" command. The number of LD per cell was estimated as the ratio of LD to the number of nuclei in each image.

### MN survival assay

Co-cultures were fixed (4% paraformaldehyde plus 0.1% glutaraldehyde in PBS, 15 min on ice) and washed twice with PBS. Then, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 30 min followed by incubation with BS: 10 % goat serum, 2% bovine serum albumin, 0,1% triton X-100 in PBS for 1 h at RT. Cells were incubated overnight with rabbit anti-beta-III



tubulin antibody (1:3000; Abcam, #ab18207 RRID: AB\_444319) in BS at 4 °C. After washing three times with PBS, cells were incubated with horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:500, Thermo Fisher Scientific, #31,460, RRID: AB\_228341) for 1 h at RT, followed by three washes with PBS and 3,3'-diaminobenzidine developing. MN survival was evaluated by direct counting of cells displaying neurites longer than four cell bodies diameter (Cassina et al., 2002; Martínez-Palma et al., 2019) using a Nikon Eclipse TE 200 microscope.

### Statistics

All data analysis and statistics were performed using GraphPad Prism 9 software (RRID:SCR\_002798). Data are presented as mean  $\pm$  SEM of values obtained from at least three independently prepared cultures performed in duplicates or triplicates. Tests used were ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc multiple comparisons. Statistical signification was determined at  $p < 0.05$ .

## Results

### 1) Silencing PDK2 mRNA reduced phosphorylated PDH in cultured astrocytes

To down-regulate PDK2 expression in cultured astrocytes, confluent astrocyte monolayers were incubated with siRNA for PDK2, PDK1, or negative control (NC) siRNA without targets. Incubation with siRNA against PDK2 successfully reduced PDK2 but not PDK1 mRNA expression, as measured by qPCR (Figure 1A). Notably, PDK activity, assessed as the ratio of phosphorylated to total PDH measured by immunoblotting against specific antibodies, was significantly diminished in PDK2 siRNA-treated astrocytes with no variation in total PDH immunoreactivity (Figure 1B). No phosphorylated/total PDH ratio difference was found in PDK1 siRNA or NC siRNA-treated astrocytes.

### 2) PDK2 mRNA knockdown in SOD1G93A expressing astrocytes increases mitochondrial bioenergetic parameters.

To study whether PDK2 knockdown could increase the mitochondrial respiration of SOD1G93A astrocytes, confluent SOD1G93A astrocytes were incubated with siRNA for PDK2 or NC siRNA, and OCR was measured before and after the addition of specific inhibitors and an uncoupler of the respiratory chain and OXPHOS as indicated in methods. As previously reported (Miquel et al., 2012), reduced respiratory capacity was detected in SOD1G93A astrocytes compared to non-Tg astrocytes. Silencing PDK2 mRNA or DCA exposure enhanced OCR in SOD1G93A astrocytes to the extent found in the non-Tg ones (Figure 2A).

SOD1G93A astrocytes exhibited reduced basal, ATP production-linked, and maximal respiration compared to non-Tg astrocytes (Figure 2B) as previously reported for other SOD1G93A-expressing cell types (Pharaoh et al., 2019). Upon PDK2 siRNA or DCA treatment, ATP production-linked and maximal respiration were significantly increased in SOD1G93A astrocytes (Figure 2B). No significant change in basal respiration was observed following PDK2-siRNA or DCA treatment. No changes were seen in non-mitochondrial and ATP-independent

respiration in any treatment group.

In addition, spare respiratory capacity and the respiratory indexes coupling efficiency and respiratory control ratio (RCR) were reduced in SOD1G93A-expressing compared to non-Tg astrocytes (Figure 2C). This indicates a reduced ability of the electron transport chain to respond to an increase in energy demand, a lower coupling of the electron transport chain to ADP phosphorylation, and a diminished overall mitochondrial respiratory function, respectively (Brand & Nicholls, 2011). PDK2 knockdown or DCA treatment showed a significant increase in all these indexes to the level shown by non-Tg astrocytes.

Finally, simultaneous measurement of OCR and ECAR under basal conditions and induced stress (upon addition of oligomycin and FCCP) revealed a switch in the energy phenotype profile of PDK2 siRNA and DCA-treated SOD1G93A astrocytes toward a more energetic phenotype (Figure 2D), similar to that of non-Tg astrocytes, suggesting that control SOD1G93A astrocytes undergo a reduced overall mitochondrial respiratory function that can be modulated by the applied treatments.

### 3) PDK2 mRNA knockdown in SOD1G93A astrocytes modifies mitochondrial network morphology.

The improvement of mitochondrial respiratory function in PDK2-silenced SOD1G93A astrocytes was associated with morphological changes in the mitochondrial network as detected by live confocal microscopy with mitotracker green labeling (Figure 3). After imaging processing involving binarization and skeleton analysis, two types of mitochondrial structures were recognized: networks (mitochondrial structures with at least three branches) and individuals (isolated mitochondria, which could be punctate -a single pixel in the skeletonized image- or rods -unbranched structures with two or more pixels in the skeletonized image-), as previously reported (Bakare et al., 2021; Valente et al., 2017). Smaller individual mitochondria and more fragmented networks were found in SOD1G93A astrocytes compared to the filamentous mitochondrial network morphology exhibited by non-Tg astrocytes (Figure 3A). This is in agreement with previous reports on SOD1G93A-expressing glial cells (Jiménez-Riani et al., 2017; Joshi et al., 2019; Martínez-Palma et al., 2019). In contrast, when treated with DCA or PDK2 siRNA, SOD1G93A astrocytes exhibit a mitochondrial network morphology reminiscent of that of non-Tg astrocytes (Figure 3A). Consequently, mean mitochondrial length (including all branches), as well as mean mitochondrial rod/branch length (mean length of rod-like mitochondria or branches in mitochondrial networks), was significantly reduced in SOD1G93A astrocytes compared to non-Tg ones (Figure 3B). These parameters were increased in PDK2 siRNA or DCA-treated SOD1G93A astrocytes to the level of non-Tg astrocytes but were not in NC siRNA-treated SOD1G93A astrocytes (Figure 3B). In addition, the percentage of mitochondria adopting a network-like interconnected morphology was reduced in SOD1G93A astrocytes (where there was a higher percentage of isolated mitochondria) compared to non-Tg astrocytes, and it was significantly increased in the case of cells treated with PDK2 siRNA or DCA, to a similar level as in non-Tg astrocytes.

#### 4) PDK2 Knockdown reduced lipid droplets accumulation in SOD1G93A astrocytes

Inhibition of mitochondrial respiration is associated with lipid droplet accumulation in various cell types (Liu et al., 2015), including glial cells. In addition, SOD1G93A expressing glial cells exhibit increased lipid inclusions (Jiménez-Riani et al., 2017). Therefore, we analyzed whether PDK silencing may affect these organelles in SOD1G93A astrocytes. Examination of Oil red O-stained astrocytes showed cytoplasmic accumulation of labeled round bodies of varying size surrounding the cell nucleus, an image consistent with lipid droplets (LD; Figure 4A). LD exhibited a heterogeneous distribution across the astrocyte monolayer. Quantification of the number of LD per cell revealed the previously reported increase in the number of LD in SOD1G93A astrocytes (Velebit et al., 2020) relative to non-Tg astrocytes. Importantly, there was a significant reduction in LD following silencing or pharmacological inhibition of PDK2 in SOD1G93A astrocytes (Figure 4B).

#### 5) PDK2 knockdown enhanced the ability of SOD1G93A astrocytes to support motor neuron survival via Nrf2 activation.

Next, the effect of PDK2 silencing on SOD1G93A astrocyte toxicity to motor neurons (MNs) was assessed. As previously reported (Vargas et al., 2006), SOD1G93A astrocytes exhibited a reduced ability to support MN survival compared to non-Tg ones. The number of MN that survived after 72 h on top of SOD1G93A astrocyte monolayers was reduced by ~50% compared to that obtained from non-Tg astrocyte/MN co-cultures. Silencing PDK2 mRNA on SOD1G93A-expressing astrocytes significantly increased MN survival in co-culture to the level reached on top of non-Tg astrocytes or DCA-treated SOD1G93A astrocytes. No effect was found with NC siRNA (Figure 5A).

Since PDK2 knockdown increased the mitochondrial respiratory activity and induced structural changes in the mitochondrial network of SOD1G93A astrocytes, and at the same time inhibited their neurotoxic activity, we sought to find clues as to which mechanisms could be involved. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a prominent player in supporting the structural and functional integrity of the mitochondria (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015), and its induction has proven neuroprotective in the SOD1G93A astrocyte-motor neuron co-culture model (Díaz-Amarilla et al., 2016; Vargas et al., 2006). To analyze the role of Nrf2 on the recovery of MN survival on top of PDK2-silenced SOD1G93A astrocytes, Nrf2 expression was simultaneously reduced by selective siRNA-mediated knockdown. Reducing Nrf2 expression abolished the beneficial effects of PDK2 siRNA on the ability of SOD1G93A astrocytes to support motor neuron survival (Figure 5B).

## Discussion

Herein, we demonstrate that downregulation of the major astrocytic PDK isoform (PDK2) expression in SOD1G93A bearing astrocytes modulates the energy phenotype profile inducing a metabolic switch characterized by an increase in mitochondrial respiratory function and a remodeling of the mitochondrial network morphology to the level of non-Tg astrocytes.

Importantly, this selective mRNA knockdown improves the ability of SOD1G93A astrocytes to support motor neuron survival by a mechanism mediated by nuclear transcription factor Nrf2. Our results further strengthen the hypothesis that mitochondrial function in astrocytes is crucial to sustaining motor neuron survival in ALS.

Cell to cell communication critically influences MN survival in ALS. We and others have reported that SOD1G93A astrocytes and aberrant glial cells selectively kill surrounding MN (Di Giorgio et al., 2007; Díaz-Amarilla et al., 2011; Nagai et al., 2007; Vargas et al., 2006). We have proposed that a metabolic reprogramming characterized by reduced mitochondrial respiratory activity with a decreased capacity to respond to energetic demands occurs in SOD1G93A expressing astrocytes, which is critically associated with the reduced ability to maintain MN survival (Cassina, Miquel, Martínez-Palma, & Cassina, 2021). This was supported by the results of treating SOD1G93A astrocytes with the metabolic modulator DCA (Miquel et al., 2012). DCA-treated astrocytes presented increased mitochondrial bioenergetics and improved MNs survival in co-culture. On top of that, oral administration of DCA to SOD1G93A animals increased survival associated with higher mitochondrial respiratory activity in the spinal cord and delayed MN survival, suggesting that metabolic modulation may offer a new therapeutic target to delay disease progression.

A key target in metabolic modulation is the PDC, a mitochondrial gatekeeping enzyme that links glycolysis with the citric acid cycle and the subsequent OXPHOS (Patel & Roche, 1990; Takubo et al., 2013). PDC is a large complex containing three core enzymatically active subunits: pyruvate dehydrogenase (PDH), dihydrolipoamide acetyltransferase, and dihydrolipoyl dehydrogenase (Hiromasa, Fujisawa, Aso, & Roche, 2004; Hitosugi et al., 2011). PDH directly oxidizes pyruvate (Fan et al., 2014) and harbors regulatory serine residues that act as phosphorylation targets (Kolobova, Tuganova, Boulatnikov, & Popov, 2001). The PDC is under tight and complex regulation by PDK isoforms 1–4, with expression in peripheral and central tissues (Jha et al., 2012). The previously mentioned role of DCA as a metabolic modulator is based on its known action as a PDK inhibitor, with positive effects on ALS models (Martínez-Palma et al., 2019; Miquel et al., 2012; Palamiuc et al., 2015). A more recently described PDK inhibitor, phenylbutyrate, has also shown promising effects in ALS (Del Signore et al., 2009; Paganoni et al., 2020; Ryu et al., 2005), even exhibiting a synergistic effect with DCA (Ferriero, Iannuzzi, Manco, & Brunetti-Pierri, 2015). The PDK2 isoform is one of the most abundant in astrocytes (Halim et al., 2010) and exhibits negligible expression levels in neurons. PDK2 isoform knockdown resulted in reduced PDK2 expression in cultured astrocytes and, more importantly, diminished PDH phosphorylation, leading to increased OXPHOS activity. Indeed, bioenergetic mitochondrial parameters and indexes were significantly increased by PDK2 knockdown or DCA treatment in SOD1G93A astrocytes. These results indicate that SOD1G93A astrocytes either have fewer mitochondria or their mitochondria undergo reduced respiratory activity, showing decreased ability to respond to energy demands. Significantly, this was reverted by the specific PDK2 siRNA treatment. These results indicate that the PDK2 isoform is a major determinant of astrocytic PDH activity state, as previously shown (Rahman et al., 2020).

Besides increasing mitochondrial respiratory function, knockdown of PDK2 mRNA expression in SOD1G93A bearing astrocytes modified their mitochondrial network morphology. During glial reactivity in ALS, astrocytes undergo a metabolic shift from OXPHOS to glycolysis, associated

with mitochondrial morphology changes to adapt to the new metabolic system (Cassina et al., 2021). Mitochondria switches from a branched connected respiratory active elongated network into clustered, fragmented organelles with decreased OXPHOS, which has been previously described in several cell types (Galloway, Lee, & Yoon, 2012; Sauvanet, Duvezin-Caubet, di Rago, & Rojo, 2010) including SOD1G93A aberrant glial cells (Martínez-Palma et al., 2019). The significant decrease in mean mitochondrial length and the mean mitochondrial rod/branched length displayed by SOD1G93A astrocytes compared to non-Tg ones, along with fewer mitochondrial networks, indicate a higher organelle fragmentation in SOD1G93A astrocytes. PDK-silencing or DCA treatment induced a significant increase in the mentioned parameters suggesting that mitochondria have coalesced into a complex network structure when increasing OXPHOS. Taken together, the detailed morphologic description and the respirometry data provide a complete overview of astrocyte mitochondria that may assist in identifying the subtle differences between healthy control and disease-associated SOD1G93A astrocytes.

The metabolic switch induced by PDK2 silencing reduced lipid droplets (LDs) content in SOD1G93A astrocytes. LDs are dynamic organelles that are regulated in response to different cellular and physiological conditions, including mitochondrial dysfunction (Renne & Hariri, 2021). The mitochondrial respiratory activity provides ATP and NADPH to support the synthesis of fatty acids and glycolytic precursors from the tricarboxylic acid cycle (e.g., citrate) for esterification into triacylglycerides in the endoplasmic reticulum and for the storage in LDs (Smolič, Zorec, & Vardjan, 2021). LDs increase in astrocytes submitted to hypoxia (Smolič, Tavčar, et al., 2021) or ROS toxicity (Islam et al., 2019). Interestingly, SOD1G93A astrocytes have been shown to increase ROS formation (Vargas et al., 2006), and SOD1G93A aberrant glial cells exhibit a high amount of LDs by TEM (Jiménez-Riani et al., 2017). Lipidomic analysis in the spinal cords of SOD1G93A rats showed an accumulation of lipids, mainly cholesteryl esters and ceramides, with further alterations linked to disease progression and a reduction in cardiolipin levels, reflecting mitochondrial adaptations (Chaves-Filho et al., 2019). The sequestration of lipids in droplets could reflect a protective mechanism against oxidative stress and lipotoxicity, avoiding lipid membrane peroxidation (Bailey et al., 2015; Olzmann & Carvalho, 2019). Our observation of LDs reduction associated with an increase in mitochondrial OXPHOS activity further support that a metabolic switch is occurring in SOD1G93A astrocytes after treatment.

A major finding of our work is that silencing PDK2 in SOD1G93A astrocytes restored their ability to support motor neuron survival. We have previously addressed that antioxidants and Nitric Oxide synthase inhibitors improved mitochondrial respiration in SOD1G93A astrocytes and restored their ability to support motor neuron survival (Cassina et al., 2008). Nrf2 is the master antioxidant transcriptional regulator against oxidative stress that binds to the antioxidant response element (ARE) in the regulatory regions of target genes. In normal conditions, Nrf2 is bound to Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), which promotes its degradation by the ubiquitin proteasome pathway (Kansanen, Kuosmanen, Leinonen, & Levonen, 2013). During oxidative stress, the interaction between Nrf2 and Keap1 is disrupted, allowing Nrf2 to accumulate in the nucleus, where it activates genes containing an ARE sequence within their promoters, leading to an induction of antioxidant response (Kensler, Wakabayashi, & Biswal, 2007). The antioxidant response is essential to maintain the capacity

of astrocytes to support motor neuron survival (Díaz-Amarilla et al., 2016; Vargas et al., 2006). Here, the SOD1G93A ability to support MN survival induced by the PDK2 silencing was abolished when Nrf2 was simultaneously knocked down, further supporting that Nrf2 signaling is necessary for astrocyte-mediated MN protection.

Interestingly, SOD1G93A astrocytic reduced mitochondrial function can be improved by the PDK inhibitor DCA (Miquel et al., 2012), suggesting that it is not irreversible damage but instead a metabolic adaptation to the neurodegenerative microenvironment. Similarly, the reduced mitochondrial activity and high proliferative capacity demonstrated by aberrant SOD1G93A glial cells were reduced by DCA treatment (Martínez-Palma et al., 2019). Notably, an association between glial mitochondrial respiration and the ability of astrocytes to support surrounding MN survival was found in both studies (Cassina et al., 2021). DCA is a PDK inhibitor (Stacpoole, 2017) with the same inhibitory action between different enzyme isoforms. Higher expression of PDK2 and PDK4 is revealed in astrocytes compared to neurons (Halim et al., 2010), which is consistent with the higher PDH $\alpha$  phosphorylation status, lower PDC activity, and higher lactate production displayed by cultured astrocytes (Pellerin & Magistretti, 2012). Then PDK2 arises as a key target to modulate astrocytic mitochondrial function, reducing surrounding MN loss and inducing a disease modifying effect in ALS.

Our results emphasize that mitochondrial function in astrocytes is a critical feature in maintaining the survival of neighboring MNs and indicate that inducing a cell-specific metabolic switch may offer a new therapeutic window to modulate astrocyte-mediated toxicity in ALS.

## References

- Al-Chalabi, A., Hardiman, O., Kiernan, M. C., Chiò, A., Rix-Brooks, B., & van den Berg, L. H. (2016). Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *The Lancet Neurology*, Vol. 15, pp. 1182–1194. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30199-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30199-5)
- Bailey, A. P., Koster, G., Guillermier, C., Hirst, E. M. A., MacRae, J. I., Lechene, C. P., ... Gould, A. P. (2015). Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell*, 163(2), 340–353. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.020>
- Bakare, A. B., Meshrkey, F., Lowe, B., Molder, C., Rao, R. R., Zhan, J., & Iyer, S. (2021). MitoCellPhe reveals mitochondrial morphologies in single fibroblasts and clustered stem cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 321(4), C735–C748. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00231.2021>
- Bowker-Kinley, M. M., Davis, W. I., Wu, P., Harris, R. A., & Popov, K. M. (1998). Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical Journal*, 329(1), 191–196. <https://doi.org/10.1042/bj3290191>
- Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, 435(2), 297–312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>
- Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de Leon, A., ... Radi, R. (2008). Mitochondrial Dysfunction in SOD1G93A-Bearing Astrocytes Promotes Motor Neuron Degeneration: Prevention by Mitochondrial-Targeted Antioxidants. *Journal of*

*Neuroscience*, 28(16), 4115–4122. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5308-07.2008>

- Cassina, P., Miquel, E., Martínez-Palma, L., & Cassina, A. (2021). Glial Metabolic Reprogramming in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuroimmunomodulation*, 28(4), 204–212. <https://doi.org/10.1159/000516926>
- Cassina, P., Peluffo, H., Pehar, M., Martínez-Palma, L., Ressia, 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>
- Chaves-Filho, A. B., Pinto, I. F. D., Dantas, L. S., Xavier, A. M., Inague, A., Faria, R. L., ... Miyamoto, S. (2019). Alterations in lipid metabolism of spinal cord linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, 9(1), 11642. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48059-7>
- Clement, A. M., Nguyen, M. D., Roberts, E. A., Garcia, M. L., Boillée, S., Rule, M., ... Cleveland, D. W. (2003). Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science*, 302(5642), 113–117. <https://doi.org/10.1126/science.1086071>
- Del Signore, S. J., Amante, D. J., Kim, J., Stack, E. C., Goodrich, S., Cormier, K., ... Ferrante, R. J. (2009). Combined riluzole and sodium phenylbutyrate therapy in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 10(2), 85–94. <https://doi.org/10.1080/17482960802226148>
- Di Giorgio, F. P., Carrasco, M. A., Siao, M. C., Maniatis, T., & Eggan, K. (2007). Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nature Neuroscience*, 10(5), 608–614. <https://doi.org/10.1038/nn1885>
- Díaz-Amarilla, P., Miquel, E., Trostchansky, A., Trias, 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 and Medicine*, 95, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.013>
- Díaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trias, E., Cragolini, 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>
- Fan, J., Kang, H.-B., Shan, C., Elf, S., Lin, R., Xie, J., ... Chen, J. (2014). Tyr-301 Phosphorylation Inhibits Pyruvate Dehydrogenase by Blocking Substrate Binding and Promotes the Warburg Effect. *Journal of Biological Chemistry*, 289(38), 26533–26541. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.593970>
- Ferriero, R., Iannuzzi, C., Manco, G., & Brunetti-Pierri, N. (2015). Differential inhibition of PDKs by phenylbutyrate and enhancement of pyruvate dehydrogenase complex activity by combination with dichloroacetate. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(5), 895–904. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9808-2>
- Galloway, C. A., Lee, H., & Yoon, Y. (2012). Mitochondrial morphology—emerging role in bioenergetics. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(12), 2218–2228. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.035>

- 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>
- Hiromasa, Y., Fujisawa, T., Aso, Y., & Roche, T. E. (2004). Organization of the Cores of the Mammalian Pyruvate Dehydrogenase Complex Formed by E2 and E2 Plus the E3-binding Protein and Their Capacities to Bind the E1 and E3 Components. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6921–6933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308172200>
- Hitosugi, T., Fan, J., Chung, T.-W., Lythgoe, K., Wang, X., Xie, J., ... Chen, J. (2011). Tyrosine Phosphorylation of Mitochondrial Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Is Important for Cancer Metabolism. *Molecular Cell*, 44(6), 864–877. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.015>
- Holness, M. J., Bulmer, K., Smith, N. D., & Sugden, M. C. (2003). Investigation of potential mechanisms regulating protein expression of hepatic pyruvate dehydrogenase kinase isoforms 2 and 4 by fatty acids and thyroid hormone. *Biochemical Journal*, 369(3), 687–695. <https://doi.org/10.1042/bj20021509>
- 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*, 99(3), 1604–1609. <https://doi.org/10.1073/pnas.032539299>
- Islam, A., Kagawa, Y., Miyazaki, H., Shil, S. K., Umaru, B. A., Yasumoto, Y., ... Owada, Y. (2019). FABP7 Protects Astrocytes Against ROS Toxicity via Lipid Droplet Formation. *Molecular Neurobiology*, 56(8), 5763–5779. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1489-2>
- Jiménez-Riani, M., Díaz-Amarilla, P., Isasi, E., Casanova, G., Barbeito, L., & Olivera-Bravo, S. (2017). Ultrastructural features of aberrant glial cells isolated from the spinal cord of paralytic rats expressing the amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1G93A mutation. *Cell and Tissue Research*, 370(3), 391–401. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2681-1>
- Joshi, A. U., Minhas, P. S., Liddelow, S. A., Haileselassie, B., Andreasson, K. I., Dorn, G. W., & Mochly-Rosen, D. (2019). Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 22(10), 1635–1648. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0486-0>
- Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Leinonen, H., & Levonen, A.-L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*, 1(1), 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 89–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046>
- Kolobova, E., Tuganova, A., Boulatniov, I., & Popov, K. M. (2001). Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochemical*



*Journal*, 358(1), 69. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3580069>

- Leonard, A. P., Cameron, R. B., Speiser, J. L., Wolf, B. J., Peterson, Y. K., Schnellmann, R. G., ... Rohrer, B. (2015). Quantitative analysis of mitochondrial morphology and membrane potential in living cells using high-content imaging, machine learning, and morphological binning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(2), 348–360. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.002>
- Liu, L., Zhang, K., Sandoval, H., Yamamoto, S., Jaiswal, M., Sanz, E., ... Bellen, H. J. (2015). Glial Lipid Droplets and ROS Induced by Mitochondrial Defects Promote Neurodegeneration. *Cell*, 160(1–2), 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.019>
- Lydell, C. P., Chan, A., Wambolt, R. B., Sambandam, N., Parsons, H., Bondy, G. P., ... Allard, M. F. (2002). Pyruvate dehydrogenase and the regulation of glucose oxidation in hypertrophied rat hearts. *Cardiovascular Research*, 53(4), 841–851. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00560-0](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00560-0)
- Martínez-Palma, L., Miquel, E., Lagos-Rodríguez, V., Barbeito, L., Cassina, A., & Cassina, P. (2019). Mitochondrial Modulation by Dichloroacetate Reduces Toxicity of Aberrant Glial Cells and Gliosis in the SOD1G93A Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 16(1), 203–215. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0659-7>
- 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), e34776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034776>
- 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>
- Olzmann, J. A., & Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 137–155. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>
- Paganoni, S., Macklin, E. A., Hendrix, S., Berry, J. D., Elliott, M. A., Maiser, S., ... Cudkowicz, M. E. (2020). Trial of Sodium Phenylbutyrate–Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 383(10), 919–930. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1916945>
- 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 Molecular Medicine*, 7(5), 526–546. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404433>
- Patel, M. S., & Korotchkina, L. G. (2006). Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), 217. <https://doi.org/10.1042/BST20060217>
- Patel, M. S., & Roche, T. E. (1990). Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes 1. *The FASEB Journal*, 4(14), 3224–3233. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.14.2227213>
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (2012). Sweet Sixteen for ANLS. *Journal of Cerebral Blood*

- Flow & Metabolism*, 32(7), 1152–1166. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.149>
- Pharaoh, G., Sataranatarajan, K., Street, K., Hill, S., Gregston, J., Ahn, B., ... Van Remmen, H. (2019). Metabolic and Stress Response Changes Precede Disease Onset in the Spinal Cord of Mutant SOD1 ALS Mice. *Frontiers in Neuroscience*, 13(MAY), 487. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00487>
- Rahman, M. H., Bhusal, A., Kim, J.-H., Jha, M. K., Song, G. J., Go, Y., ... Suk, K. (2020). Astrocytic pyruvate dehydrogenase kinase-2 is involved in hypothalamic inflammation in mouse models of diabetes. *Nature Communications*, 11(1), 5906. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19576-1>
- Renne, M. F., & Hariri, H. (2021). Lipid Droplet-Organelle Contact Sites as Hubs for Fatty Acid Metabolism, Trafficking, and Metabolic Channeling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.726261>
- Ryu, H., Smith, K., Camelo, S. I., Carreras, I., Lee, J., Iglesias, A. H., ... Ferrante, R. J. (2005). Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of Neurochemistry*, 93(5), 1087–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03077.x>
- Saneto, R., & 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.
- Sauvanet, C., Duvezin-Caubet, S., di Rago, J.-P., & Rojo, M. (2010). Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(6), 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.12.006>
- Smith, E. F., Shaw, P. J., & De Vos, K. J. (2019). The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 710, 132933. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.052>
- Smolič, T., Tavčar, P., Horvat, A., Černe, U., Halužan Vasle, A., Tratnjek, L., ... Vardjan, N. (2021). Astrocytes in stress accumulate lipid droplets. *Glia*, (February), 1–23. <https://doi.org/10.1002/glia.23978>
- Smolič, T., Zorec, R., & Vardjan, N. (2021). Pathophysiology of Lipid Droplets in Neuroglia. *Antioxidants*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.3390/antiox11010022>
- Stacpoole, P. W. (2017). Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 109(11), 1–14. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx071>
- Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C. I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., ... Suda, T. (2013). Regulation of Glycolysis by Pdk Functions as a Metabolic Checkpoint for Cell Cycle Quiescence in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 12(1), 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.011>
- Taylor, J. P., Brown, R. H., & Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS: From genes to mechanism. *Nature*, 539(7628), 197–206. <https://doi.org/10.1038/nature20413>
- 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>

- Vargas, M. R., Pehar, M., Cassina, P., Beckman, J. S., & Barbeito, L. (2006). Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75<sup>NTR</sup>-dependent motor neuron apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, *97*(3), 687–696. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03742.x>
- Velebit, J., Horvat, A., Smolič, T., Prpar Mihevc, S., Rogelj, B., Zorec, R., & Vardjan, N. (2020). Astrocytes with TDP-43 inclusions exhibit reduced noradrenergic cAMP and Ca<sup>2+</sup> signaling and dysregulated cell metabolism. *Scientific Reports*, *10*(1), 6003. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62864-5>
- Zhang, W., Zhang, S.-L., Hu, X., & Tam, K. Y. (2015). Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target? *International Journal of Biological Sciences*, *11*(12), 1390–1400. <https://doi.org/10.7150/ijbs.13325>

## Figure Legends:

**Figure 1.** PDK2 siRNA treatment reduced PDK2 mRNA expression and PDK activity in astrocytes. **A)** PDK2 relative mRNA expression in astrocytes treated with PDK2 siRNA, PDK1 siRNA, Negative control siRNA (NC siRNA), and control astrocytes, quantified by qPCR. **B)** Relative levels of phosphorylated PDH and total PDH in cultured astrocytes. Top pane: Representative western blot using antibodies against phosphorylated PDH (PDH P<sub>Ser293</sub>), total PDH E1 $\alpha$ , and  $\alpha$ -tubulin as loading control of protein samples of astrocytes treated with PDK2 siRNA, PDK1 siRNA, Negative control siRNA (NC siRNA) of vehicle. Bottom pane: Phosphorylated PDH/total PDH ratio quantification. All data are presented as mean  $\pm$  SEM from 4-5 independent experiments. \* $p < 0.05$ .

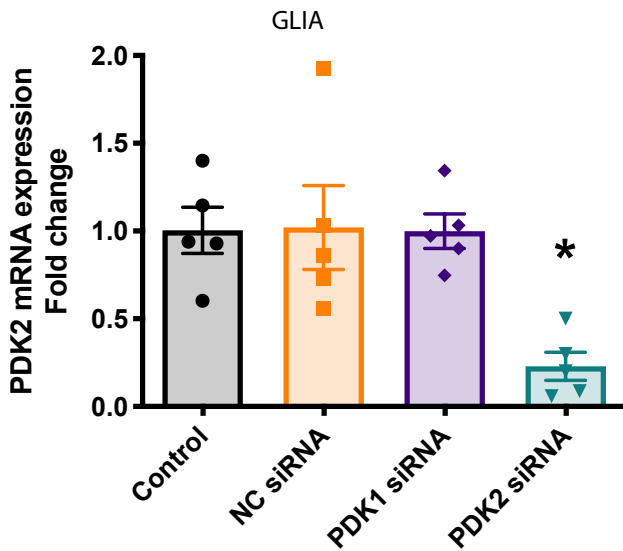
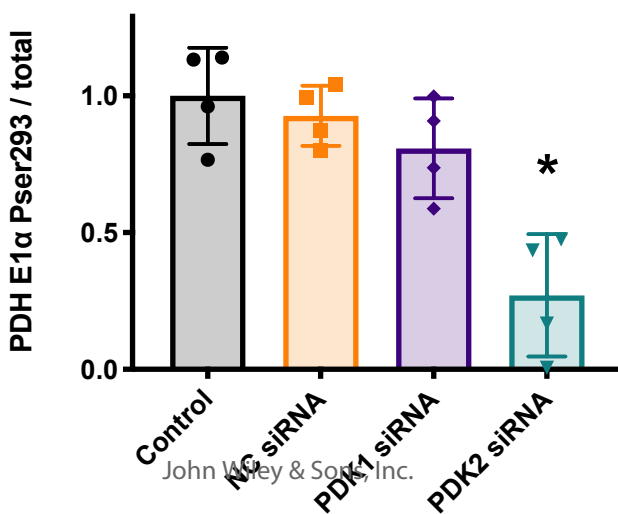
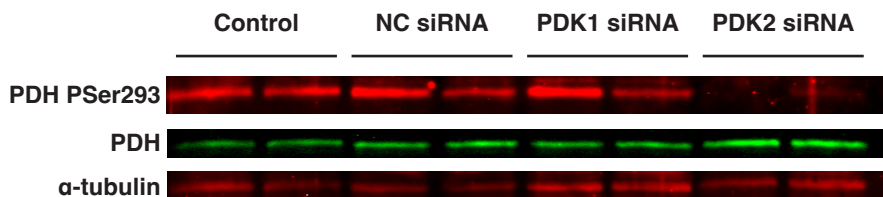
**Figure 2.** PDK2 knockdown improves the mitochondrial function of SOD1G93A-expressing astrocytes. **A)** Representative slope curves of the oxygen consumption rate (OCR) for non-Tg and SOD1G93A astrocytes (control and treated with PDK2 siRNA or DCA over time. Arrows indicate the time of addition of oligomycin, FCCP, and rotenone + antimycin A. **B)** Respiratory parameters (basal respiration, ATP-independent respiration, respiration linked to ATP production, maximal, and non-mitochondrial respiration) obtained from the OCR profiles of the different treatment groups. Data are expressed as % of non-Tg control. **C)** Spare respiratory capacity, Coupling efficiency, and Cell respiratory control ratio (RCR) of the same treatment groups. **D)** Cell energy phenotype diagram showing normalized oxygen consumption rate (OCR) and normalized extracellular acidification rate (ECAR) for non-Tg and SOD1G93A astrocytes treated as stated, under basal conditions (hollow symbols) or stress conditions (upon addition of oligomycin and FCCP; filled symbols). All data are presented as mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ .

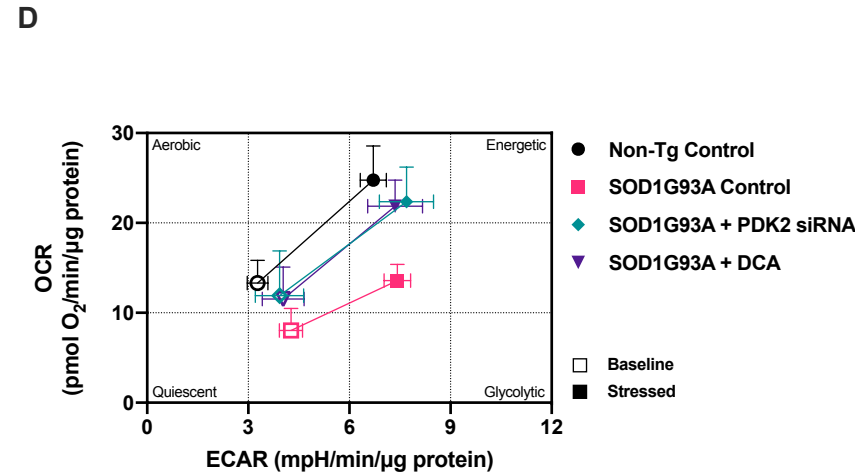
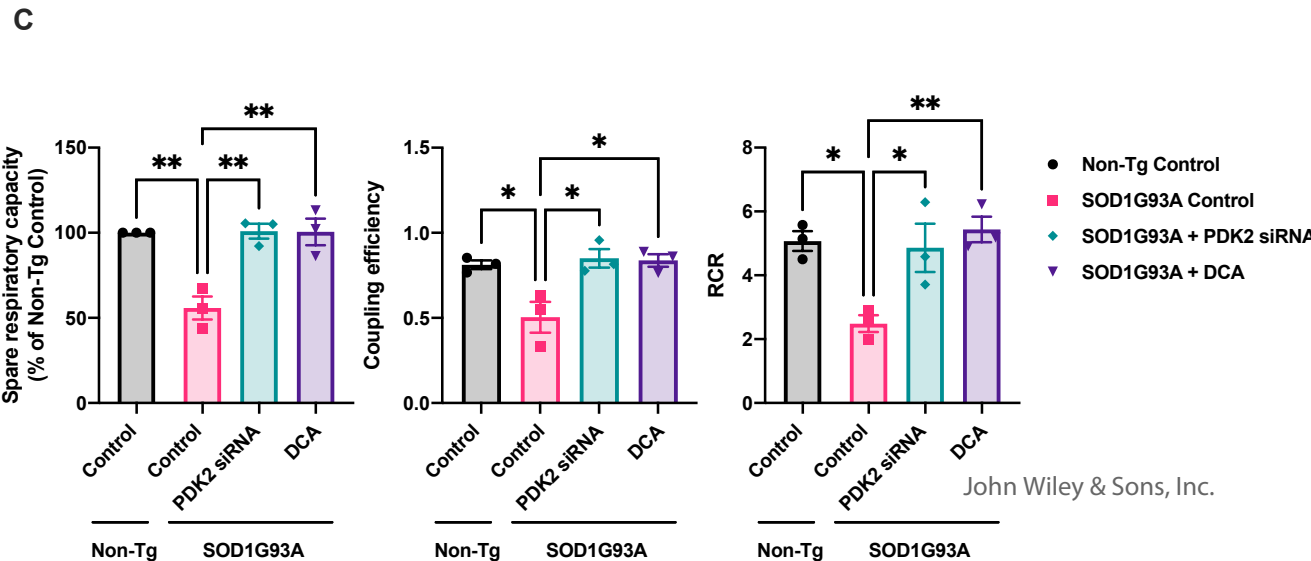
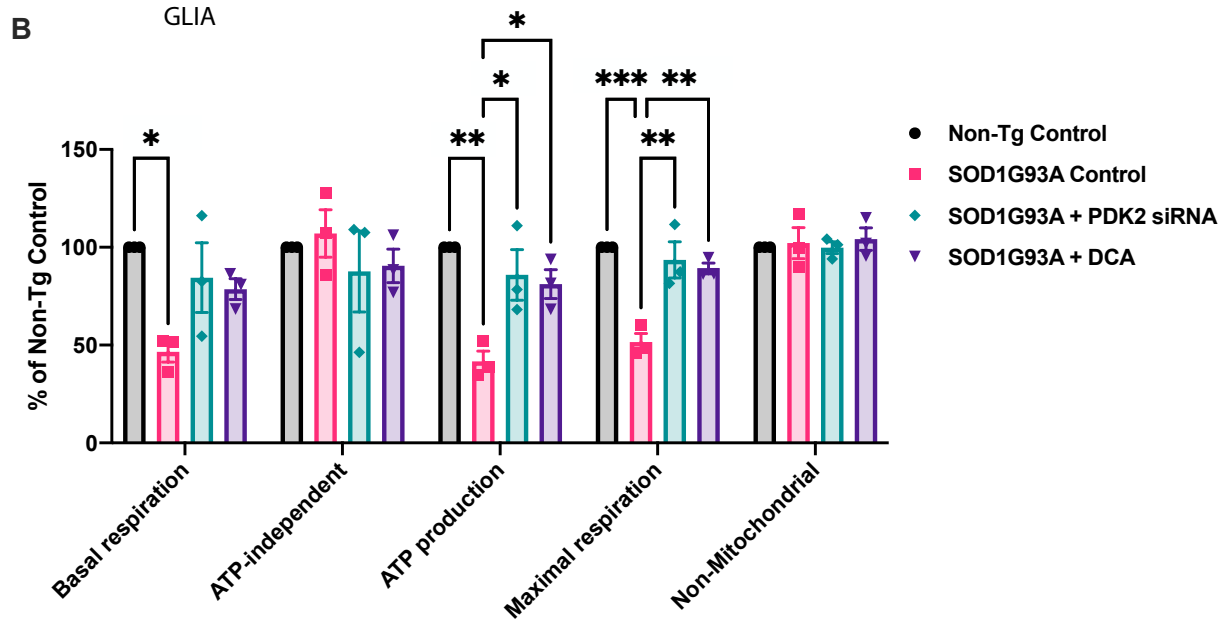
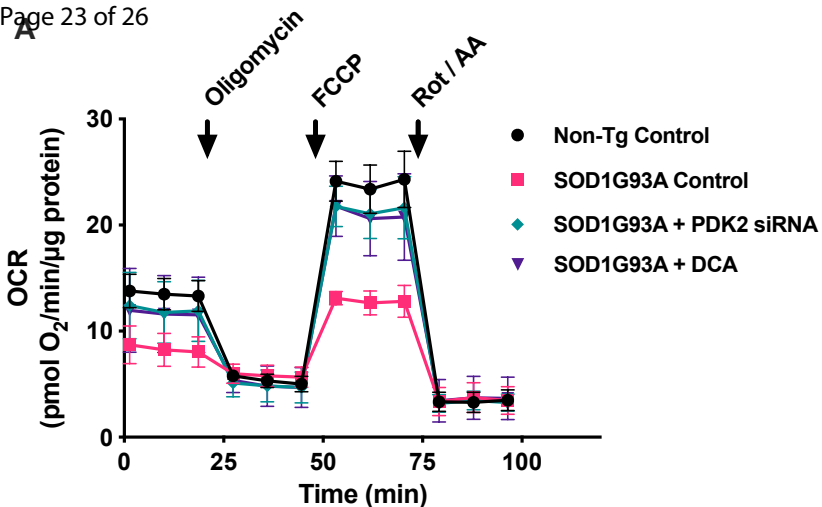
**Figure 3.** Effects of PDK2 silencing on SOD1G93A-expressing astrocyte mitochondrial network structure. **A)** Representative images of mitotracker green-labeled non-Tg or SOD1G93A astrocyte mitochondria in control conditions or treated with negative control siRNA (NC siRNA), PDK2 siRNA, or DCA. Scale bar: 10  $\mu$ m. **B)** Mitochondrial network morphological parameters: mean mitochondrial length, mean mitochondrial rod/branch length, and percentage of mitochondria forming networks (3 or more branches), obtained from the different treatment groups. All data are presented as mean  $\pm$  SEM from 4 experiments. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ .

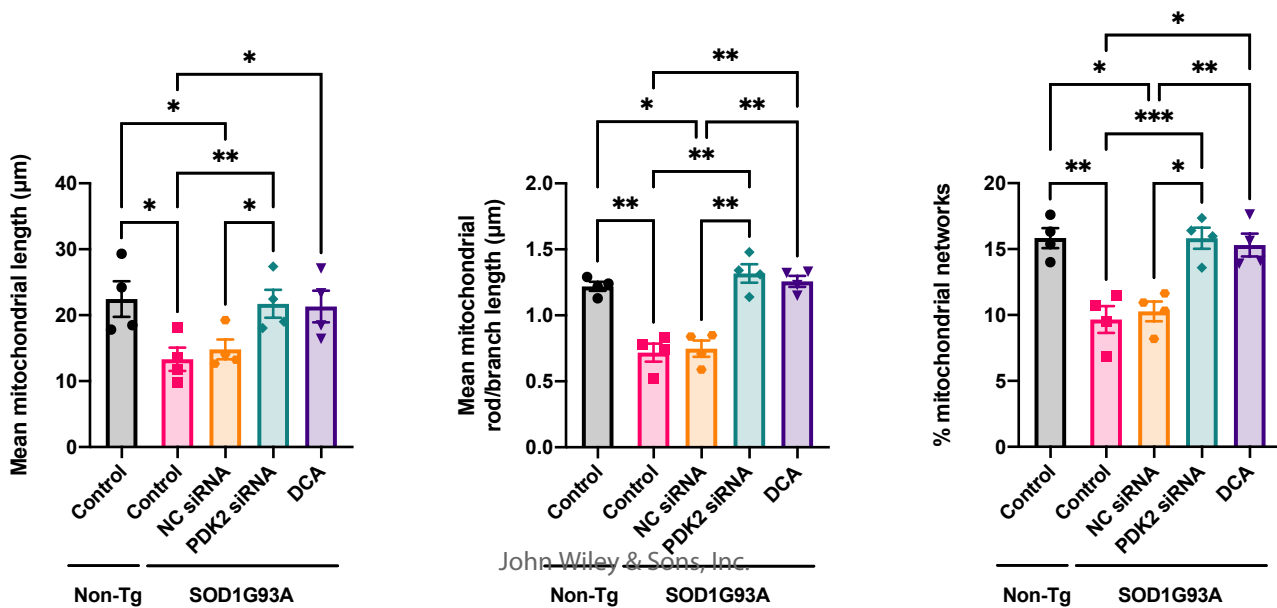
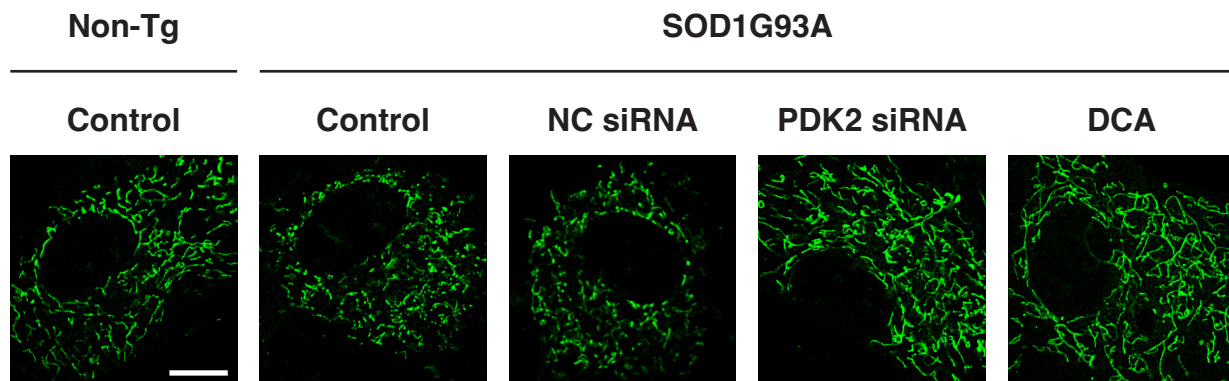
**Figure 4.** PDK2 knockdown alters lipid droplet accumulation in SOD1G93A astrocytes. **A)** Representative images from non-Tg or SOD1G93A astrocyte monolayers treated as indicated, stained with Oil Red O to label LD (red), and processed for GFAP immunofluorescence (green)

and DAPI for nuclei labeling (blue). Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . **B)** Quantification of the mean number of Oil Red O-stained structures per cell in the indicated groups. All data are presented as mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments. \* $p < .05$ .

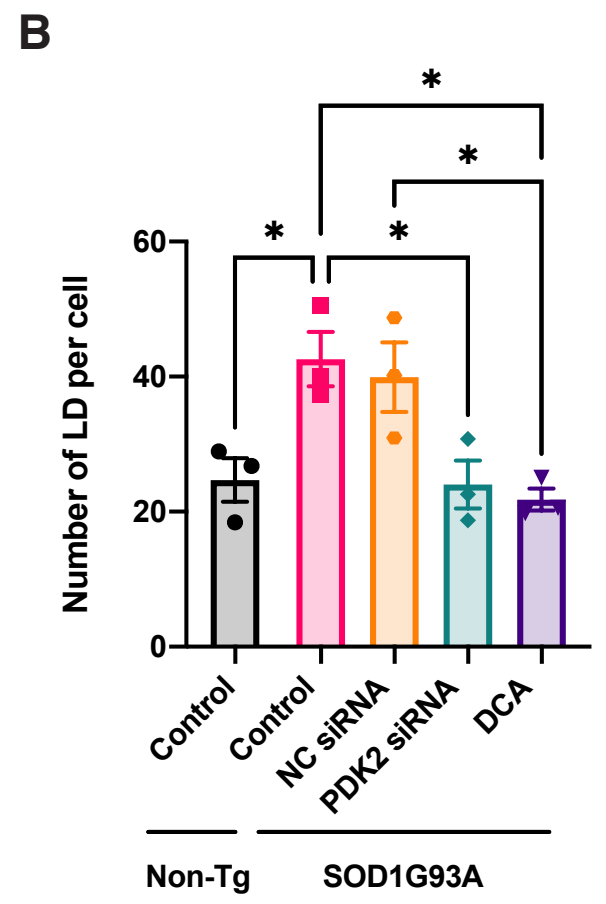
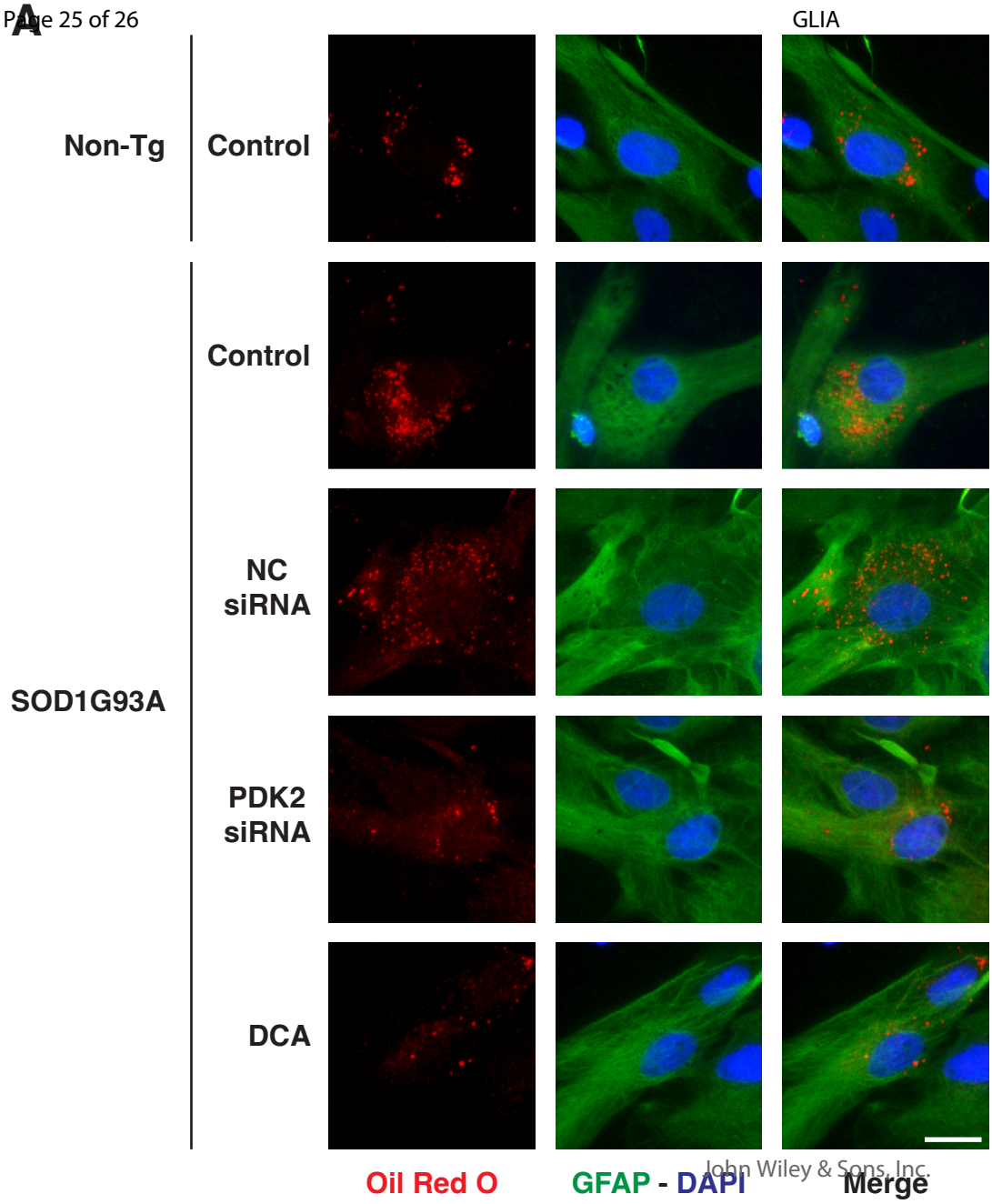
**Figure 5.** PDK2 knockdown recovers the ability of SOD1G93A astrocytes to support MN survival. **A)** non-Tg motor neuron (MN) survival on top of non-Tg or SOD1G93A astrocyte monolayers following incubation with PDK2 siRNA, negative control (NC) siRNA, or DCA. **B)** non-Tg MN survival on top of non-Tg astrocytes or SOD1G93A astrocyte treated with PDK2 siRNA, Nrf2 siRNA, combined PDK2+Nrf2 siRNA, or NC siRNA. Data are presented as the percentage of MN survival on top of a non-Tg astrocyte monolayer (control). All data are presented as mean  $\pm$  SEM from 3-5 experiments. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ .

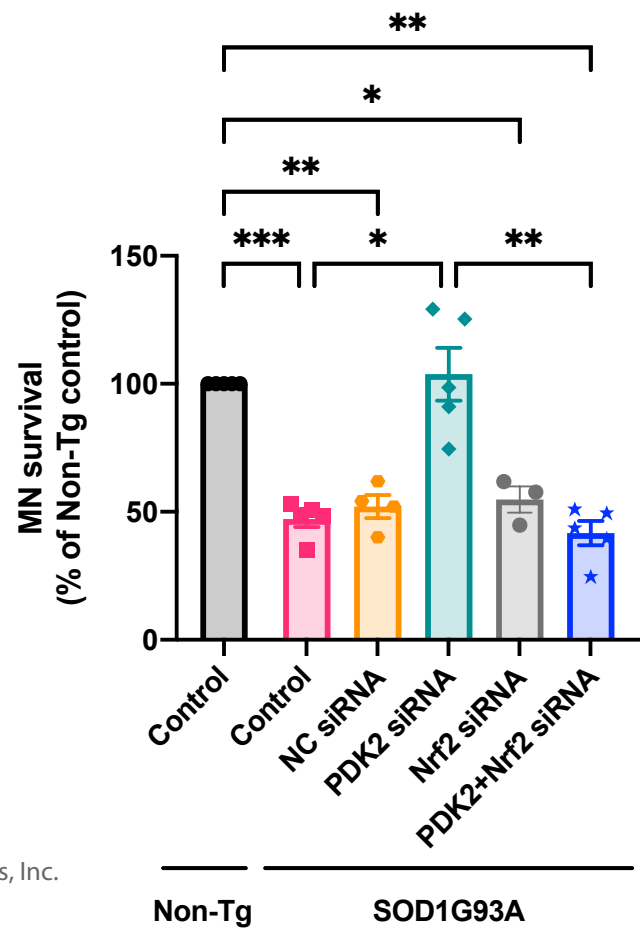
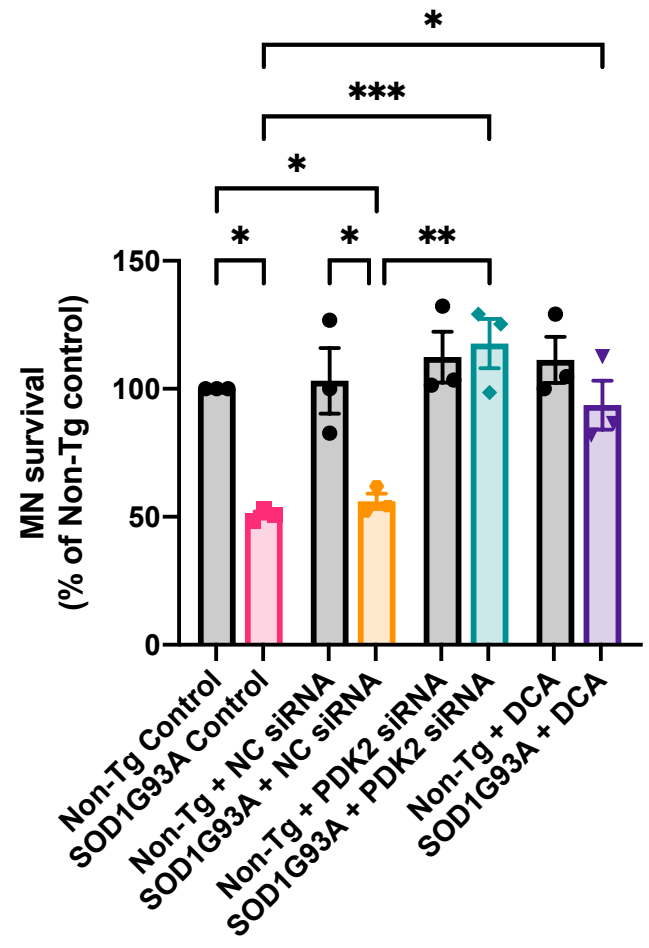
**A****B**











# RESULTADOS COMPLEMENTARIOS: EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE NRF2 UTILIZANDO NITROLÍPIDOS EN MODELOS CELULARES Y ANIMALES DE ELA

En el marco de la tesis se ensayaron otras estrategias buscando blancos alternativos para la modulación de la toxicidad mediada por astrocitos a motoneuronas en modelos de ELA. Una de estas aproximaciones involucró tratamientos que estimulen la activación del factor Nrf2, estrategia complementaria a los resultados presentados en los capítulos 1 y 2.

## INTRODUCCIÓN

Como una estrategia adicional al tratamiento con antioxidantes para disminuir el daño nitrooxidativo en los astrocitos SOD1G93A, estudiamos en este modelo el efecto de compuestos capaces de estimular las defensas antioxidantes propias de la célula. El factor de transcripción Nrf2 es uno de los principales reguladores de las defensas celulares frente a estímulos oxidativos o tóxicos mediante la estimulación de la expresión de genes involucrados en la respuesta celular al estrés oxidativo o a la detoxificación (He, Ru, et al., 2020). Uno de sus dominios proteicos le permite reconocer y unirse a elementos de la respuesta antioxidante (ARE) en los promotores de genes que codifican para proteínas protectoras. Entre estas se encuentran enzimas involucradas en las fase I, II y III de detoxificación, como NQO1, carbonil reductasas, Hemoxigenasa-1 (HO-1), y enzimas involucradas en vías antioxidantes generales, como glutamato-cisteína ligasa, glutatión sintetasa (GSS), tiorredoxinas, peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión S-transferasas, entre otras (He, Antonucci, et al., 2020; He, Ru, et al., 2020). Estas proteínas citoprotectoras codificadas por genes blanco de Nrf2 son esenciales para la protección frente a una gran variedad de agentes tóxicos y oxidativos, y alteraciones en las mismas subyacen varias enfermedades. Y numerosas drogas que estimulan la vía de Nrf2 han sido estudiadas para el tratamiento de enfermedades en las que juega un rol importante el stress oxidativo (Dodson et al., 2019). Nrf2 participa en una red regulatoria compleja, coordinando la regulación de aspectos metabólicos, inflamación, autofagia, proteostasis, la fisiología mitocondrial e incluso respuestas inmunitarias (Ahmed et al., 2017; He, Ru, et al., 2020). Vale la pena destacar además, que Nrf2 juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad funcional y estructural de las mitocondrias, afectando por ejemplo el potencial de membrana mitocondrial, la oxidación de ácidos grasos, disponibilidad de sustratos para la respiración y síntesis de ATP, y la biogénesis mitocondrial (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015).

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que la inducción de la vía de Nrf2 mediante FGF-2 tiene efectos neuroprotectores en el modelo de ELA de cocultivo de astrocitos SOD1G93A y motoneuronas (Vargas et al., 2006). Un mecanismo alternativo para la activación de Nrf2 es el tratamiento con nitrolípidos (nitroalquenos, nitro-ácidos grasos). Los nitrolípidos son productos electrofílicos formados por la nitración de ácidos grasos no saturados (Rubbo et al., 1994). Estas especies activan cascadas de señalización mediante modificaciones postraduccionales de aminoácidos nucleofílicos susceptibles en proteínas reguladoras y enzimas. También pueden activar las vías de estrés térmico y la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 (Kansanen et al., 2011; Villacorta et al., 2007).

En el marco de una colaboración con el laboratorio de Homero Rubbo en el Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina nos interesó evaluar el efecto de la estimulación de las defensas antioxidantes en astrocitos SOD1G93A con nitrolípidos, moléculas que ellos han diseñado y caracterizado y evaluar su efecto sobre la capacidad de los astrocitos de mantener la supervivencia de motoneuronas en cultivo y sobre la progresión de síntomas y supervivencia de ratones SOD1G93A.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *MATERIALES*

Los medios de cultivo se obtuvieron de Life Technologies, Inc. Los cebadores utilizados se obtuvieron de Integrated DNA Technologies, Inc. El ácido araquidónico (AA) y el ácido oleico (OA) fueron comprados a Nu-Check Prep (Elysian, MN). El resto de los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Merck) a no ser que se especifique lo contrario.

### *NITROLÍPIDOS*

La síntesis de ácido nitro-oleico (NO<sub>2</sub>-OA) y nitro-araquidónico (NO<sub>2</sub>-AA) se realizaron como fue descrito previamente (Baker et al., 2005; Trostchansky et al., 2007; Woodcock et al., 2013).

### *CONSIDERACIONES ÉTICAS*

Los procedimientos que implicaron la utilización de animales se realizaron siguiendo las pautas internacionales y aprobados por la Comisión honoraria de experimentación animal de la Universidad de la República (<http://www.chea.csic.edu.uy>; CHEA), protocolo #1038.

## ANIMALES

Las ratas (*Rattus norvegicus*) y ratones (*Mus musculus*) se alojaron en un ambiente controlado (ciclo luz-oscuridad de 12 horas;  $20 \pm 1$  °C), con acceso al alimento y agua *ad libitum*. No más de seis hembras o machos por jaula.

Las ratas macho transgénicas hemicigotas NTac: SD-Tg (SOD1G93A) L26H fueron adquiridas de Taconic (Hudson, NY, USA) y se cruzaron con ratas Sprague–Dawley. Los neonatos se genotiparon por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como fue descrito previamente (Howland et al., 2002).

Los ratones transgénicos portadores de la SOD1 humana con mutación G93A, cepa B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur (Gurney et al., 1994), fueron adquiridos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). La cepa se mantuvo por cruzamiento de machos portadores hemicigotas con hembras B6SJLF1. Las crías se genotiparon por PCR como se describió previamente. Para los estudios se utilizaron animales hemicigotas para el SOD1G93A y sus compañeros de camada no Tg.

## CULTIVOS DE ASTROCITOS

Los cultivos de astrocitos espinales fueron realizados partiendo de neonatos de rata SOD1G93A o no Tg, genotipados por PCR, de acuerdo al protocolo de Saneto and De Vellis (Saneto & De Vellis, 1987) con leves modificaciones (Cassina et al., 2002). Brevemente, se disecó la médula espinal, removiendo cuidadosamente las meninges y el tejido fue cortado en pequeños pedazos con bisturí y disociado enzimáticamente con 0.25% tripsina-EDTA por 25 min at 37 °C. La tripsinización se detuvo con medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), de alta glucosa (4,5 g/l), suplementado con HEPES (3,6 g/l), penicilina (100 IU/mL), streptomycin (100 mg/mL), y 10% (v/v) suero bovino fetal (FBS). Se adicionó ADNasa I (50 µg/mL) y se disgregó mecánicamente utilizando una micropipeta de 1000 µL. La suspensión celular se pasó por una malla de 80-µm y se centrifugó por 10 min a 300 x g. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio DMEM suplementado y se plaquearon a una densidad  $1,5 \times 10^6$  células por frasco de 25-cm<sup>2</sup>. Tras cambios de medio cada 48-72 h, al alcanzar confluencia los cultivos se agitaron por 48 h a 400 rpm, y luego fueron tratados por 48 h con arabinósido de citosina (Ara-C) para eliminar células que sigan proliferando (fundamentalmente microglía contaminante). Finalmente, los cultivos purificados de astrocitos se amplificaron mediante su tripsinización y plaqueo a menor densidad, en placas de Petri de 35 mm o en placas de 24 o 4 pocillos (a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>). Los cultivos se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% SFB (s-DMEM). Al cabo de una semana los astrocitos forman monocapas confluentes y se encuentran listos para ser tratados.

### *TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO*

Monocapas confluentes de astrocitos espinales neonatales fueron cambiadas a medio DMEM suplementado con 2% de suero fetal bovino previamente a los tratamientos. Los astrocitos fueron tratados por 24h con vehículo (MetOH, 1:400), AA, OA, NO<sub>2</sub>-AA o NO<sub>2</sub>-OA (1 μM - 5 μM), y luego se aisló el ARN o se prosiguió con los experimentos de cocultivo.

### *TRANSFECCIÓN DE siRNA*

Monocapas 70% confluentes de astrocitos espinales neonatales fueron cambiadas a medio DMEM suplementado con 2% de SFB antes de los tratamientos. La transfección de siRNA se realizó utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los astrocitos se transfectaron con 40 nM de siRNAs prediseñados (DsiRNAs, IDT) contra Nrf2 (ID#RNC.RNAI.N031789.12.1, RNC.RNAI.N031789.12.2, RNC.RNAI.N031789.12.3, IDT) o DsiRNA control negativo (DS NC1, IDT). 24 h después, se aisló el ARN total utilizando trizol (Invitrogen).

### *CULTIVOS DE MOTONEURONAS*

Los cultivos enriquecidos en motoneuronas espinales se obtuvieron a partir de embriones de 15 días (E15) de ratas Wistar mediante una combinación de centrifugación diferencial e inmunoselección de acuerdo al procedimiento descrito en (Henderson et al., 1995) con algunas modificaciones (Cassina et al., 2002). Brevemente, las médulas fueron disecadas, se removieron sus meninges y se aisló la región ventral de la médula separándola del asta dorsal con bisturí. Las regiones ventrales fueron fraccionadas y tripsinizadas en buffer fosfato salino (PBS; 137 mM NaCl<sub>2</sub>, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) en presencia de 0,02% tripsina durante 12 minutos a 37 °C. El proceso de tripsinización se detuvo por el agregado de medio de cultivo L15 completo (L15 de Leibovitz suplementado con: bicarbonato de sodio (22 mM), glucosa (20 mM), insulina (5 μg/mL), progesterona (21 nM), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 μg/mL), suero de caballo (2%) y 0,1% seroalbúmina bovina (BSA)). Seguidamente se procedió a la disociación mecánica del tejido en presencia de 0,02 mg/mL de DNAasa-1 en medio L15 completo, las células se separaron del detrito por centrifugación sobre un colchón de BSA (4%, 300g, 10 minutos). El precipitado celular fue resuspendido y sometido a una centrifugación diferencial sobre un colchón de Optiprep (1:10 en L15, 800g, 15 minutos). Este paso enriquece en motoneuronas la fracción en la interfase medio – optiprep (>70%). Posteriormente se realizó un paso adicional de purificación mediante inmunofluorescencia

empleando un anticuerpo monoclonal contra el receptor de neurotrofinas P75 (sobrenadante de hibridoma IgG192), en donde la suspensión celular se incubó 1 hora en placas de bacteriología pretratadas con este anticuerpo. Las células no adherentes fueron desechadas y las motoneuronas adheridas se eluyeron por lavado con sobrenadante de hibridoma IgG192. Finalmente, las motoneuronas fueron colectadas por centrifugación en un colchón de BSA. Se plaquearon a una densidad de 300 células/cm<sup>2</sup> sobre monocapas de astrocitos espinales confluentes en medio L15 completo, o sobre un sustrato de poliornitina-laminina y cultivadas en medio Neurobasal.

### *PCR*

Monocapas confluentes de astrocitos fueron tratadas como se explicó previamente, con vehículo, ácidos grasos o ácidos grasos nitrados por 24 h. Se aisló el ARN total utilizando TRIzol reagent (Invitrogen). 2 µg de ARN fueron sometidos a transcripción utilizando la SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las PCRs se realizaron en tubos de 20 µl con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de cDNA y 20 pmol de cada cebador en un sistema StepOnePlus Real-Time PCR System (Life technologies). Los parámetros de ciclado fueron: 95 °C, 10 s; 55 °C, 10 s; 72 °C, 15 s. Los cebadores utilizados (IDT, Integrated DNA Technologies) fueron: para Nrf2 5'-TTC CTC TGC TGC CAT TAG TCA GTC-3' y 5'- GCT CTT CCA TTT CCG AGT CAC TG-3'; para GAPDH 5-CAC TGA GCA TCT CCC TCA CAA-3' y 5'-TGG TAT TCG AGA GAA GGG AGG-3' .

### *GRUPOS EXPERIMENTALES DE RATONES*

Ratones hembra SOD1G93A y no Tg fueron divididos al azar en diferentes grupos para analizar los efectos del NO<sub>2</sub>-OA, OA o vehículo sobre la progresión de los síntomas y supervivencia. La administración se realizó de forma intraperitoneal, 3 veces por semana desde el día 90 de vida (momento aproximado de inicio de síntomas en este modelo) hasta la muerte. La dosis fue de 8 mg/kg de OA o NO<sub>2</sub>-OA, disueltos en polietilenglicol (PEG)-etanol (70:30) . El inicio de síntomas se determinó como la primera observación de movimiento anormal o debilidad en los miembros. El punto final se estableció como el momento de parálisis completa de ambos miembros posteriores y la incapacidad de los animales de enderezarse luego de haber sido apoyados de costado. Se registró el peso, fuerza de agarre de los miembros (utilizando un grip-strength meter, San Diego Instruments) y desempeño en la prueba de rotarod (utilizando un rotarod Letica LE 8200), dos veces a la semana desde la sexta semana de vida. Los animales se dividieron en los siguientes grupos: (1) SOD1G93A + PEG

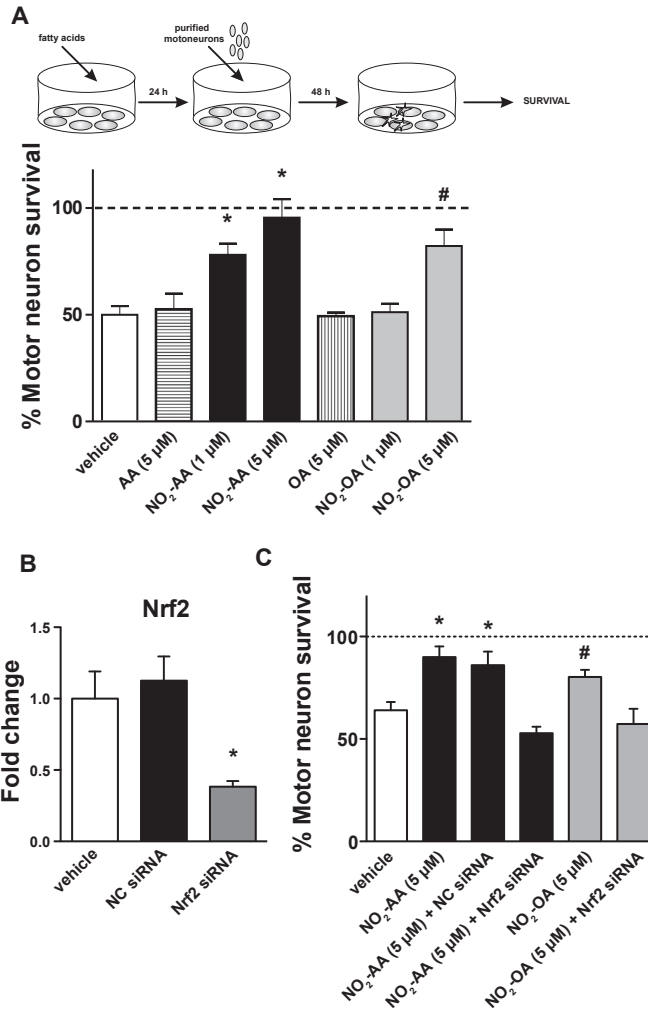
(polietilenglicol, vehículo), n = 17; (2) SOD1G93A + OA, n = 15; (3) SOD1G93A + NO<sub>2</sub>-OA, n = 17; (4) no Tg + PEG, n = 9; (5) no Tg + OA, n=5; (6) non-Tg+NO<sub>2</sub>-OA, n=10. Para algunos estudios, y para minimizar el uso de animales, los grupos (5) y (6) se eliminaron al no ser estadísticamente diferentes en el desempeño motor que el grupo (4). La fuerza de agarre se determinó en todos los animales; para la prueba de rotarod se seleccionó un subgrupo de los grupos 1 (n = 10), 2 (n = 10), 3 (n = 10), y 4 (n = 9). Al día 100 (10 días de tratamiento), se retiraron 4 animales de cada grupo para obtener muestras para estudios histológicos.

## RESULTADOS

### *EL TRATAMIENTO CON NITROLÍPIDOS INHIBE LA MUERTE DE MOTONEURONAS MEDIADA POR ASTROCITOS SOD1G93A*

Tratamos astrocitos SOD1G93A con dos nitrolípidos, el ácido nitro-araquidónico (NO<sub>2</sub>-AA) y ácido nitro-oleico (NO<sub>2</sub>-OA) y evaluamos su efecto sobre la supervivencia neuronal *in vitro*. Las monocapas confluentes de astrocitos fueron tratadas por 24 h con vehículo (MetOH, 1:400), o concentraciones de 1 μM o 5 μM de AA, OA, NO<sub>2</sub>-AA o NO<sub>2</sub>-OA. Luego del tratamiento se lavaron las monocapas y se plaquearon las motoneuronas, evaluando su supervivencia en cocultivo por conteo directo 72 h después (Figura 13). La supervivencia de motoneuronas sobre la monocapa de astrocitos SOD1G93A se redujo al 50% respecto a la supervivencia sobre astrocitos no Tg (100%, línea punteada), como fue descrito previamente. El pretratamiento de los astrocitos con NO<sub>2</sub>-AA y NO<sub>2</sub>-OA resultó en un aumento de la supervivencia neuronal sobre astrocitos SOD1G93A, a niveles similares a los de los astrocitos no Tg (Figura 13A). Para evaluar si los efectos protectores de los nitrolípidos sobre la muerte neuronal mediada por astrocitos SOD1G93A eran dependientes de Nrf2, utilizamos siRNA para inhibir la expresión de Nrf2 (Figura 13B-C). La transfección de astrocitos SOD1G93A con siRNA contra Nrf2 previo a su tratamiento con nitrolípidos anuló los efectos beneficiosos de los nitrolípidos sobre la supervivencia neuronal (Figura 13C).





**Figura 13.- El tratamiento de astrocitos SOD1G93A con nitrolípidos previene su actividad neurotóxica hacia motoneuronas. A):** Supervivencia de motoneuronas sobre monocapas de astrocitos tratados con vehículo, AA (5  $\mu$ M), OA (5 $\mu$ M), NO<sub>2</sub>-AA (1 – 5  $\mu$ M), o NO<sub>2</sub>-OA (1 – 5  $\mu$ M). El tratamiento de astrocitos no Tg con los compuestos no tuvo efectos significativos sobre la supervivencia (línea punteada, 100%). \* significativamente diferente del vehículo y AA ( $p < 0,05$ ); # significativamente diferente del vehículo y de OA ( $p > 0,05$ ). **B)** Niveles relativos de ARNm de Nrf2 en astrocitos tratados con siRNA contra Nrf2 o controles (vehículo o siRNA control negativo sin blanco en el transcriptoma: NC siRNA) \* significativamente diferente del vehículo y de NC siRNA ( $p < 0,05$ ). **C)** Supervivencia de motoneuronas sobre monocapas de astrocitos tratados con NO<sub>2</sub>-AA o NO<sub>2</sub>-OA a continuación de un pre-tratamiento con Nrf2-siRNA o NC-siRNA. El tratamiento con Nrf2-siRNA abolió los efectos beneficiosos del NO<sub>2</sub>-AA y NO<sub>2</sub>-OA sobre la supervivencia neuronal. \* significativamente diferente del vehículo y NO<sub>2</sub>-AA+Nrf2-siRNA. ( $p < 0.05$ ); # significativamente diferente del vehículo y de NO<sub>2</sub>-OA+Nrf2-siRNA ( $p < 0.05$ ). Los datos se expresan como Media  $\pm$  SEM, tres experimentos realizados en triplicado.

Estos estudios resultaron en la publicación como primer autor compartido del siguiente artículo, que se adjunta al final de este capítulo (Publicación 2):

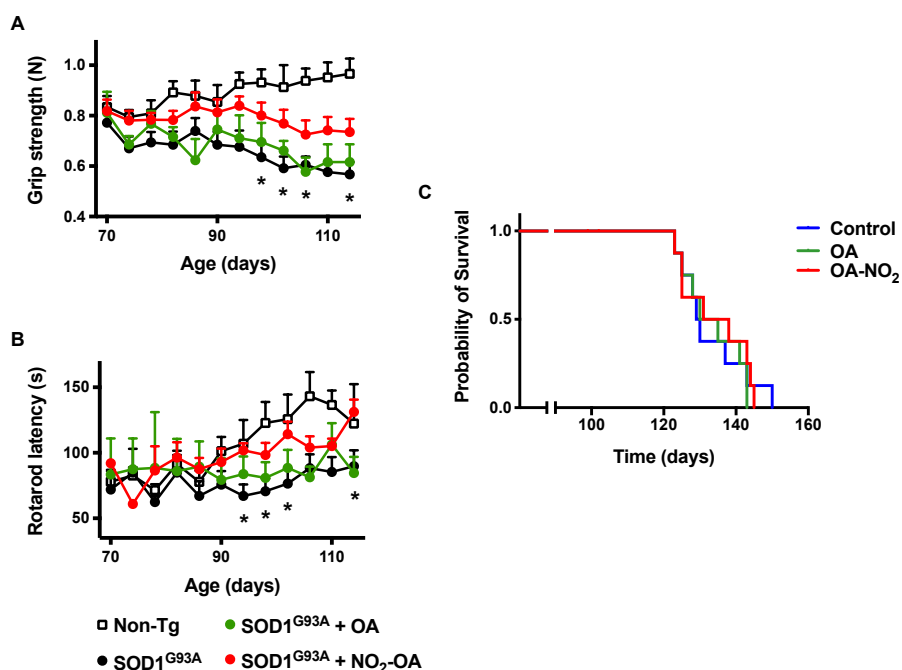
**Díaz-Amarilla, P. \*, Miquel, E. \***, Trostchansky, A., Trias, E., Ferreira, A. M., Freeman, B. A., Cassina, P., Barbeito, L., Vargas, M. R., & Rubbo, H. (2016). Electrophilic nitro-fatty acids prevent astrocyte-mediated toxicity to motor neurons in a cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis via nuclear factor erythroid 2-related factor activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 95, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.013>

### *EL NO<sub>2</sub>-OA MEJORA EL DESEMPEÑO MOTOR DE LOS RATONES SOD1G93A*

A continuación, evaluamos el efecto de uno de estos compuestos, el NO<sub>2</sub>-OA, sobre el desempeño motor y supervivencia de ratones SOD1G93A. Grupos de ratones SOD1G93A y no Tg fueron tratados con NO<sub>2</sub>-OA, OA, o vehículo (PEG: polietilenglicol) por vía intraperitoneal, 3 veces/semana. El tratamiento comenzó a los 90 días de vida, la edad a la que comienzan a mostrar síntomas motores, y continuó hasta la muerte. Evaluamos la fuerza de los miembros posteriores de los animales, su desempeño motor en la prueba de rotarod y su supervivencia (Figura 14). El tratamiento mejoró la fuerza y el desempeño motor de los ratones, retrasando la progresión de síntomas, aunque no tuvo un efecto significativo sobre la supervivencia.

Estos resultados contribuyeron a la publicación del siguiente artículo:

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. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00131>. (Trostchansky et al., 2018)



**Figura 14.- Efecto del ácido nitro-oleico sobre el desempeño motor y supervivencia de ratones SOD1G93A.** Grupos de ratones SOD1G93A y no transgénicos fueron tratados con NO<sub>2</sub>-OA, OA, o vehículo por vía intraperitoneal, 3 veces/semana, desde los 90d de vida. Se evaluó la fuerza de los miembros posteriores de los animales (A) utilizando un Grip Strength meter (San Diego Instruments), su desempeño en la prueba de rotarod (B) y supervivencia (C). \*p < 0.05, ratones SOD1G93A tratados con OA o vehículo comparados con ratones no Tg; #p < 0.05, ratones SOD1G93A tratados con NO<sub>2</sub>-OA comparados con los tratados con vehículo o OA.

## CONCLUSIONES

Los nitrolípidos son capaces de inducir una potente respuesta antiinflamatoria y antioxidante dependiente de Nrf2, capaz de prevenir la muerte neuronal en un modelo en cultivo de ELA. El ambiente oxidativo en el astrocito es un determinante clave en la supervivencia neuronal en este modelo. La administración de OA-NO<sub>2</sub> a ratones SOD1G93A desde el inicio de síntomas fue suficiente para obtener beneficios relacionados al desempeño motor (fuerza de agarre y prueba de rotarod), aunque el tratamiento no consiguió alterar la supervivencia de los animales. No descartamos que con un régimen distinto de administración (dosis y/o tiempo de inicio) se podrían conseguir otros resultados en este modelo de ELA de tan rápida progresión de síntomas.

## PUBLICACIÓN 2

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. **Díaz-Amarilla, P.\***, **Miquel, E.\***, Trostchansky, A., Trias, E., Ferreira, A. M., Freeman, B. A., Cassina, P., Barbeito, L., Vargas, M. R., & Rubbo, H. (2016). *Free Radical Biology and Medicine*, 95, 112–120.

\*primera autoría compartida



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/freeradbiomed](http://www.elsevier.com/locate/freeradbiomed)

## Original Contribution

## 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



Pablo Diaz-Amarilla<sup>a,1</sup>, Ernesto Miquel<sup>c,1</sup>, Andrés Trostchansky<sup>b,1</sup>, Emiliano Trias<sup>g</sup>, Ana M. Ferreira<sup>d</sup>, Bruce A. Freeman<sup>f</sup>, Patricia Cassina<sup>c</sup>, Luis Barbeito<sup>g</sup>, Marcelo R. Vargas<sup>e</sup>, Homero Rubbo<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica and Center for Free Radical and Biomedical Research, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup> Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>d</sup> Catedra de Inmunología, Facultad de Química y Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>e</sup> Cell and Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA

<sup>f</sup> Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, PA, USA

<sup>g</sup> Institut Pasteur of Montevideo, Montevideo, Uruguay

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 November 2015

Received in revised form

11 March 2016

Accepted 18 March 2016

Available online 22 March 2016

## Keywords:

ALS

Astrocytes

Motor neurons

Heme oxygenase

Nrf2

Nitro-fatty acids

Nitroarachidonic acid

Nitrooleic acid

## ABSTRACT

Nitro-fatty acids (NO<sub>2</sub>-FA) are electrophilic signaling mediators formed in tissues during inflammation, which are able to induce pleiotropic cytoprotective and antioxidant pathways including up regulation of Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) responsive genes. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by the loss of motor neurons associated to an inflammatory process that usually aggravates the disease progression. In ALS animal models, the activation of the transcription factor Nrf2 in astrocytes confers protection to neighboring neurons. It is currently unknown whether NO<sub>2</sub>-FA can exert protective activity in ALS through Nrf2 activation. Herein we demonstrate that nitro-arachidonic acid (NO<sub>2</sub>-AA) or nitro-oleic acid (NO<sub>2</sub>-OA) administered to astrocytes expressing the ALS-linked hSOD1<sup>G93A</sup> induce antioxidant phase II enzyme expression through Nrf2 activation concomitant with increasing intracellular glutathione levels. Furthermore, treatment of hSOD1<sup>G93A</sup>-expressing astrocytes with NO<sub>2</sub>-FA prevented their toxicity to motor neurons. Transfection of siRNA targeted to Nrf2 mRNA supported the involvement of Nrf2 activation in NO<sub>2</sub>-FA-mediated protective effects. Our results show for the first time that NO<sub>2</sub>-FA induce a potent Nrf2-dependent antioxidant response in astrocytes capable of preventing motor neurons death in a culture model of ALS.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Nitro-fatty acids (NO<sub>2</sub>-FA, nitroalkenes) are electrophilic products formed by the nitration of unsaturated fatty acids [1]. These species trigger signaling cascades via covalent and reversible post-

translational modifications of susceptible nucleophilic amino acids in transcriptional regulatory proteins and enzymes. Moreover, NO<sub>2</sub>-FA can activate heat shock [2] as well as antioxidant response pathways [3]. As electrophiles, nitroalkenes activate the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) [2,4]. Nrf2, a member of the cap “n” collar transcription factor family, represents a master regulator of the Antioxidant Response Element (ARE)-regulated genes. The binding of Nrf2 to the cis-acting DNA promoter sequence ARE allows transactivation of a group of cytoprotective genes that encode proteins known as phase-II enzymes. In normal conditions Nrf2 is bound to Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), and through a two-site interaction, the transcription factor is ubiquitinated by Cul3/Rbx1 and targeted for degradation [5,6]. During oxidative stress the two-site interaction between Nrf2 and Keap1 is disrupted, allowing Nrf2 to evade Keap1-

**Abbreviations:** NO<sub>2</sub>-FA, Nitro-fatty acids; SOD1, Cu/Zn superoxide dismutase; ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis; NO<sub>2</sub>-OA, Nitro-oleic acid; NO<sub>2</sub>-AA, Nitro-arachidonic acid; Nrf2, Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2; ARE, Antioxidant Response Element; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; HO-1, Hemoxygenase-1; tBHQ, *tert*-butylhydroquinone; AA, Arachidonic acid; OA, Oleic acid; NQO1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1; Srxn1, Sulfiredoxin 1; GCL, Glutamate-cysteine ligase

\* Correspondence to: Avda. Gral. Flores 2125, Montevideo, CP 11800, Uruguay.

E-mail address: [hrubbo@fmed.edu.uy](mailto:hrubbo@fmed.edu.uy) (H. Rubbo).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.013>

0891-5849/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

mediated ubiquitination and accumulate in the nucleus where it activates genes containing an ARE sequence within their promoters, leading to an induction of antioxidant response. Upregulation of the ARE-driven gene battery has a significant impact on the ability of the cell to withstand and survive inflammatory and metabolic stress [6]. Among phase-II enzymes, hemoxygenase-1 (HO-1) has attracted special attention because of its therapeutic effects in neurodegenerative disease models [7]. Hemoxygenase-1 oxidatively cleaves heme to biliverdin, forms CO and releases the chelated Fe<sup>2+</sup>. Bilirubin (a reduction product of biliverdin) also serves as a potent radical scavenger and protects neuronal cells against oxidative stress at nanomolar concentrations [8]. Two isoforms of heme oxygenase have been characterized: a constitutive isoform, HO-2, and the inducible enzyme, HO-1 [9]. The induction of HO-1 counteracts oxidative damage and confers cytoprotection [10,11]. In the nervous system, HO-1 can be highly induced in glia by its substrate heme and by a variety of pro-oxidant, inflammatory stimuli and trophic factors [12–15]. In accordance, increased HO-1 expression is observed in neurodegenerative diseases involving glial activation, such as Alzheimer's and Parkinson's diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) [7,16].

Amyotrophic Lateral Sclerosis is the most common adult-onset motor neuron disease caused by the progressive degeneration of motor neurons in the spinal cord, brain stem and motor cortex [17]. Approximately 10–20% of familial ALS is caused by a toxic gain-of-function induced by mutations of the Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) [18]. Rodents over-expressing mutated forms of hSOD1 generally develop an ALS-like phenotype [19,20]. Although the molecular mechanism underlying this toxic gain-of-function remains unknown, toxicity to motor neurons requires mutant SOD1 expression in non-neuronal cells as well as in motor neurons [21]. In ALS patients and rodent models, a strong glial reaction typically surrounds degenerating motor neurons [22]. Astrocytes isolated from hSOD1<sup>G93A</sup> rats [23] or mice [24] are toxic to co-cultured motor neurons, suggesting a role of glial cells in motor neuron degeneration [22,25–27].

Increased oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of ALS and a variety of antioxidants have been tested [28]. Several studies have demonstrated that Nrf2 activation in astrocytes can improve antioxidant defenses and prevent the motor neuron loss induced by SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes [23,29]. Consistently, it has been shown that ALS-mice with specific Nrf2 overexpression in astrocytes developed the onset of the disease later, increasing survival and exhibiting lower glial reactivity [30]. However, signaling by the Nrf2-ARE pathway may be initiated by several mechanisms not necessarily involving Nrf2 overexpression. In fact, there may be multiple approaches for targeting Nrf2 as therapeutic tool where exogenous and endogenous molecules have demonstrated an ability to activate Nrf2 and induce cytoprotective genes [31]. Furthermore, Nrf2 and HO-1 levels are increased and co-localized with reactive astrocytes in the degenerating lumbar spinal cord of hSOD1<sup>G93A</sup> rats, suggesting this pathway counteracts accelerated disease progression [15]. On the other hand, astrocytic induction of Nrf2 by *tert*-butylhydroquinone (tBHQ), a prototypic inducer of Nrf2 activation, has also prevented motor neuron death induced by SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes *in vitro* through an increase in glutathione biosynthesis [23]. Considering that prophylactic activation of Nrf2 in astrocytes has shown to be a plausible strategy to ameliorate neuronal dysfunction and death, herein we explored the use of nitro-arachidonic acid (NO<sub>2</sub>-AA) and nitro-oleic acid (NO<sub>2</sub>-OA) [32,33] as potential Nrf2 activators in astrocytes and their effects on motor neuron survival.

## 2. Material and methods

### 2.1. Materials

Culture media and serum were obtained from Life Technologies, Inc. Primers were obtained from Integrated DNA Technologies, Inc. Antibody to HO-1 was from StressGen Biotech, antibodies to  $\beta$ -actin was from Sigma, antibodies against carboxyl and amino termini of Nrf2 and histone H1 were from Santa Cruz Biotechnology. Arachidonic acid (AA) and oleic acid (OA) were purchased from Nu-Check Prep (Elysian, MN). All other reagents were from Sigma unless otherwise specified.

### 2.2. Nitro-fatty acids

Synthesis and quantitation of NO<sub>2</sub>-AA and NO<sub>2</sub>-OA were performed as previously and analyzed for purity by <sup>1</sup>H NMR and HPLC-MS [32,33]. A mixture of NO<sub>2</sub>-AA isomers was obtained: 12- and 15-NO<sub>2</sub>-AA (23%), 9-NO<sub>2</sub>-AA (55%) and 14-NO<sub>2</sub>-AA (22%). No differences between batches were observed. Nitro-oleic acid is an equimolar mixture of 9- and 10-nitro-octadec-9-enoic acid.

### 2.3. Cell cultures

Primary astrocytes cultures were prepared from non-Tg or hemizygous rats and mice as indicated. Animals: Transgenic ALS Sprague-Dawley rats carrying the G93A mutated human SOD1, strain NTac:SD-TgN(SOD1G93A)L26H, were obtained from Taconic (Hudson, NY; [20]) and were bred locally by crossing hemizygous male carriers to wild-type Sprague-Dawley female rats. Transgenic SOD1<sup>G93A</sup> ALS mice, strain B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur [19], were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and were bred locally by crossing hemizygous male carriers to B6SJL/F1 female hybrids. The offspring was genotyped as previously described [34]. The animals were housed under controlled conditions with free access to food and drinking water.

### 2.4. Ethics statement

Procedures using laboratory animals were in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences and were approved by the Institutional Animal Committee resolution no. 66 (Exp. no. 071140-001465-10); Comisión honoraria de experimentación animal de la Universidad de la República (CHEA; <http://www.chea.udelar.edu.uy>). The offspring was genotyped at birth as described previously [35]. The non-transgenic littermates were used as controls. Primary cortical or spinal astrocyte cultures were prepared from 1–2 day-old rat pups according to the procedure of Saneto and De Vellis with minor modifications [36]. *Rat cortical astrocytes* were used for cell yield purposes and compared with findings in spinal cord rat or mice astrocytes. Previous reports indicate that astrocyte mediated-motor neuron toxicity is detected in astrocytes from spinal cord and cerebral cortex [34] and also from rats and mice SOD1<sup>G93A</sup> transgenic rodent models of ALS [37]. Cells were plated at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in 35-mm Petri dishes or 24-well plates and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, HEPES (3.6 g/l), penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (100  $\mu$ g/ml). Astrocyte monolayers were >98% pure as determined by GFAP immunoreactivity and were devoid of OX42-positive microglial cells. **Motor neuron cultures** were prepared from embryonic day 15 (E15) wild-type rat spinal cord by a combination of OptiPrep™ gradient centrifugation and immunopanning with the monoclonal antibody Ig192 against p75 neurotrophin receptor, as previously

described [38]. Neurons were directly plated on astrocyte monolayers at a density of 300 cells/cm<sup>2</sup> and maintained for 72 h in L15 medium supplemented as previously described [36].

### 2.5. Cell treatment and transient transfection

Confluent astrocyte monolayers from cortex and spinal cord were changed to Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2% fetal bovine serum prior to treatment. Astrocytes were treated for 24 h with vehicle (MetOH, 1:400), AA, OA, NO<sub>2</sub>-AA or NO<sub>2</sub>-OA, homogenized and then proteins analyzed by Western blot. Transient transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Astrocytes were transfected with mammalian expression control vector (pEF) or dominant-negative mutant Nrf2 (Nrf2-DNM), kindly provided by Dr. Jawed Alam (Alton Ochsner Clinic Foundation, New Orleans, LA) [39]. Post-transfection astrocytes were treated with nitroalkenes as before and protein analyzed by Western blot.

### 2.6. siRNA transfection

Confluent spinal cord astrocyte monolayers were changed to Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2% fetal bovine serum prior to treatment. siRNA transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Astrocytes were transfected with 40 nM of pre-designed dicer-substrate siRNAs (DsiRNAs) targeting Nrf2 mRNA (ID#RNC.RNAI.N031789.12.1, RNC.RNAI.N031789.12.2, RNC.RNAI.N031789.12.3, IDT) or negative control DsiRNA (DS NC1, IDT) 24 h before either total RNA isolation using TRIzol reagent (Invitrogen) for quantitative PCR, or treatment with vehicle or nitrated fatty acids for co-culture experiments.

### 2.7. Whole cell and nuclear extracts

After treatment, astrocytes were washed with cold PBS and whole cell extracts were prepared in 50 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1% Triton X-100 and Complete protease inhibitor mixture (Roche) and sonicated 3 times for 3 s. Protein concentration was measured by the bicinchoninic acid method (Pierce). Nuclear cell extracts were prepared as described by Schreiber and cols. [40]. Briefly, cells were resuspended in ice-cold buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 g/ml aprotinin, and 1 g/ml leupeptin). The cells were allowed to swell on ice for 15 min, after which 0.5% Nonidet P-40 was added and the tube was vortex mixed for 10 s. The homogenate was centrifuged for 30 s and nuclear pellet was resuspended in ice-cold buffer C (20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM each of dithiothreitol, EDTA, EGTA, and phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 g/ml aprotinin, and 1 g/ml leupeptin). The tube was mixed thoroughly and vigorously rocked at 4 °C for 15 min. The nuclear extract was centrifuged at 11,000g for 5 min at 4 °C and the supernatant containing nuclear proteins was removed, quantified and stored in loading buffer for western blot.

### 2.8. Real-time PCR

Confluent astrocyte monolayers were changed to Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2% fetal bovine serum prior to treatment. Astrocytes were treated with vehicle, nitrated or non-nitrated fatty acids for 12 h. Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen). 2 µg of RNA were randomly reverse transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. PCRs were

carried out in a 20 µl reaction with 1 × SYBR Green PCR Master Mix Applied Biosystems containing 1 µl of cDNA and 20 pmoles of each specific primer in aStepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life technologies). The cycling parameters were as follows: 95 °C, 10 s; 55 °C, 10 s; 72 °C, 15 s. Specific primers for Nrf2, HO-1, NQO1, GCLC, GCLM and β-Actin were used [30]. Primers for Sulfiredoxin-1 were:

Srxn1/5'GGCTGGTACTCTTGTGCTCT  
Srxn1/3'GGGTGCTTGTCTCGAATGTGTTG.

### 2.9. Glutathione measurement

Confluent astrocyte monolayers were changed to Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2% fetal bovine serum prior to treatment. Astrocytes were treated with vehicle as control or different concentrations of AA, NO<sub>2</sub>-AA, OA or NO<sub>2</sub>-OA for 24 h. Cells were lysed with ice-cold 3% perchloric acid and total glutathione levels (GSH and GSSG) determined using the Tietze method as previously described [23]. Glutathione content was corrected by protein concentration determined as explained previously.

### 2.10. Co-culture experiments

Non-transgenic as well as SOD1<sup>G93A</sup> spinal cord astrocyte monolayers were changed to L15 medium supplemented with 0.63 mg/ml sodium bicarbonate, 5 µg/ml insulin, 0.1 mg/ml conalbumin, 0.1 mM putrescine, 30 nM sodium selenite, 20 nM progesterone, 20 mM glucose, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2% horse serum. Astrocytes were treated for 24 h with different concentrations of nitroalkenes. After washing twice with phosphate buffered saline (PBS) wild-type motor neurons were plated on top at a density of 350 cells/cm<sup>2</sup>. Co-cultures were maintained in L15 medium supplemented with 0.63 mg/ml sodium bicarbonate, 5 µg/ml insulin, 0.1 mg/ml conalbumin, 0.1 mM putrescine, 30 nM sodium selenite, 20 nM progesterone, 20 mM glucose, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2% horse serum for 48 h. Motor neuron survival was assessed after fixing the cells and immunostained for p75NTR. Counts were performed over an area of 0.9 cm<sup>2</sup> in 24-well plates and by counting all cells displaying intact neurites longer than 4 cells in diameter [26].

### 2.11. Statistics

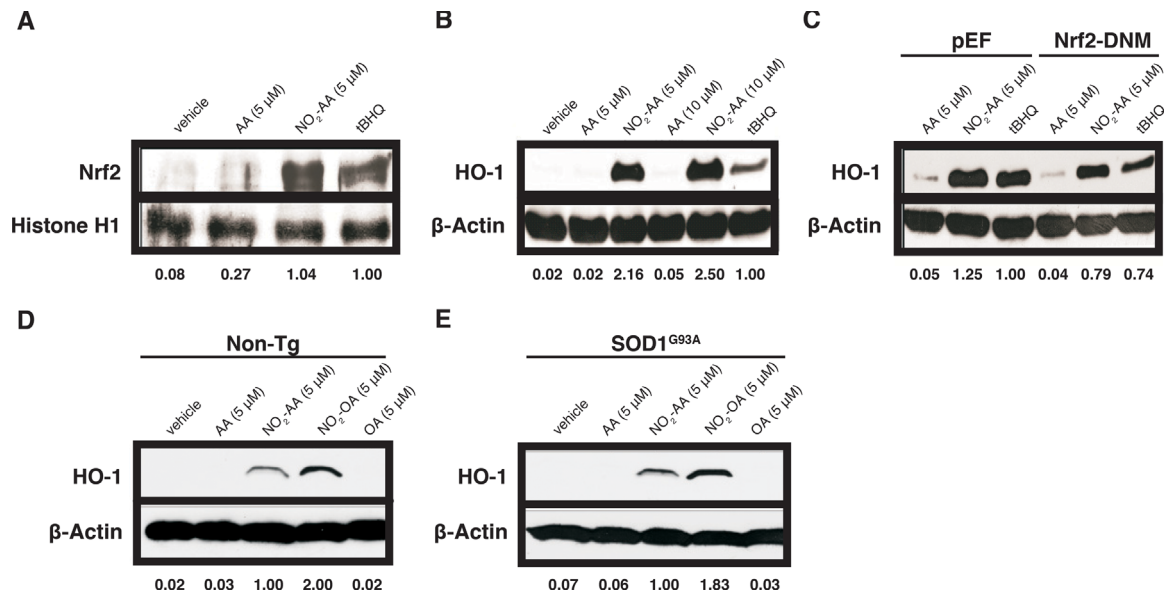
All statistics were performed using Sigmaplot 12 (Systat software, San Jose, CA, USA), GraphPad Prism 5.0 or GraphPad InStat software, version 3.06.

## 3. Results

### 3.1. NO<sub>2</sub>-FA induce Nrf2 activation-dependent HO-1 expression in astrocytes

Cultured non-transgenic (non-Tg) astrocytes were exposed to nitro-arachidonic acid (NO<sub>2</sub>-AA) or arachidonic acid (AA) 5 µM for 24 h. In these experimental conditions, NO<sub>2</sub>-AA-but not AA-induced a significant accumulation of Nrf2 in the nucleus (Fig. 1A). As a positive control *tert*-butyl hydroquinone (tBHQ), an electrophilic activator of Nrf2, was included (Fig. 1A). In addition, this treatment determined a potent increase in hemoxygenase-1 (HO-1) protein levels (Fig. 1B). As expected, HO-1 protein levels were not detected in untreated or non-nitrated fatty acid-treated cells. To further support the role of Nrf2 in HO-1 expression, transfection of astrocytes with a dominant negative Nrf2 plasmid





**Fig. 1.** NO<sub>2</sub>-FA induce HO-1 expression in astrocytes via Nrf2. (A) Nrf2 activation was determined by western blot of a nuclear extract from astrocytes treated with NO<sub>2</sub>-AA for 6h. Controls with AA or tBHQ were included. (B) Confluent astrocyte monolayers were treated with MetOH (vehicle), AA (5 and 10 μM), NO<sub>2</sub>-AA (5 and 10 μM) or tBHQ (40 μM). After 24 h, HO-1 protein levels were analyzed by western blot. (C) The Nrf2-dependent HO-1 expression was determined by treatment with AA (5 μM), NO<sub>2</sub>-AA (5 μM) or tBHQ (40 μM) of astrocytes transfected with a dominant-negative mutant Nrf2 form (Nrf2-DNM). As in figure (B), after 24 h HO-1 expression was analyzed by western blot. Controls were performed by transfecting the cells with an empty vector (pEF). Band intensities were determined and related to the condition with NO<sub>2</sub>-AA. (D) Non-transgenic (non-Tg) and (E) SOD1<sup>G93A</sup> astrocyte monolayers were treated with MetOH (vehicle), AA (5 μM), NO<sub>2</sub>-AA (5 μM), OA (5 μM), NO<sub>2</sub>-OA (5 μM) as in figure (A). After 24 h, HO-1 protein level was determined by western blot. Band intensities were determined and related to the response elicited by tBHQ (A, B, C) or NO<sub>2</sub>-AA (D, E). Results shown are representative of at least three independent experiments.

partially abrogated NO<sub>2</sub>-AA and tBHQ-induced HO-1 expression (Fig. 1C). Furthermore, we compared this effect on SOD1<sup>G93A</sup>-expressing astrocytes. As expected, NO<sub>2</sub>-AA induced HO-1 expression in both non-Tg (Fig. 1D) and SOD1<sup>G93A</sup>-expressing ones (Fig. 1E). This effect was not selective for NO<sub>2</sub>-AA since the use of nitro-oleic acid (NO<sub>2</sub>-OA) instead NO<sub>2</sub>-AA produced similar induction of HO-1.

### 3.2. NO<sub>2</sub>-FA induce Nrf2/ARE-related genes expression in non-transgenic and SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes

To confirm that the changes observed were not due to increased Nrf2 mRNA levels we performed real-time PCR on astrocytes cultures. Neither NO<sub>2</sub>-AA nor NO<sub>2</sub>-OA induced changes in the mRNA levels of Nrf2 in either non-Tg or SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes (Fig. 2A). Since HO-1 expression depends almost exclusively on *de novo* gene transcription, we analyzed NO<sub>2</sub>-FA effects on HO-1 mRNA levels. A 6-fold increase in HO-1 mRNA was observed after treatment with either NO<sub>2</sub>-AA or NO<sub>2</sub>-OA as compared with vehicle and non-nitrated fatty acids conditions (Fig. 2B). Similar results were observed when analyzing other Nrf2/ARE-related gene expression: NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and Sulfiredoxin 1 (Srxn1, Fig. 2C and D).

### 3.3. NO<sub>2</sub>-FA increase glutathione biosynthesis through the glutamate-cysteine ligase modulatory subunit

The increase in intracellular GSH levels is indicative of the activation of the Nrf2/ARE pathway. Transgenic SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes incubated with either NO<sub>2</sub>-AA or NO<sub>2</sub>-OA exhibited greater levels of GSH+GSSG compared to control AA and oleic acid (OA) treatments (Fig. 3A). This seems to be due to increased expression of the modulatory subunit of glutamate-cysteine ligase (GCLM, Fig. 3B), which is the rate-controlling enzyme in GSH synthesis. No effects on the expression of the catalytic subunit (GCLC, Fig. 3C)

were observed. Similar results were observed in non-Tg cells (Fig. 3).

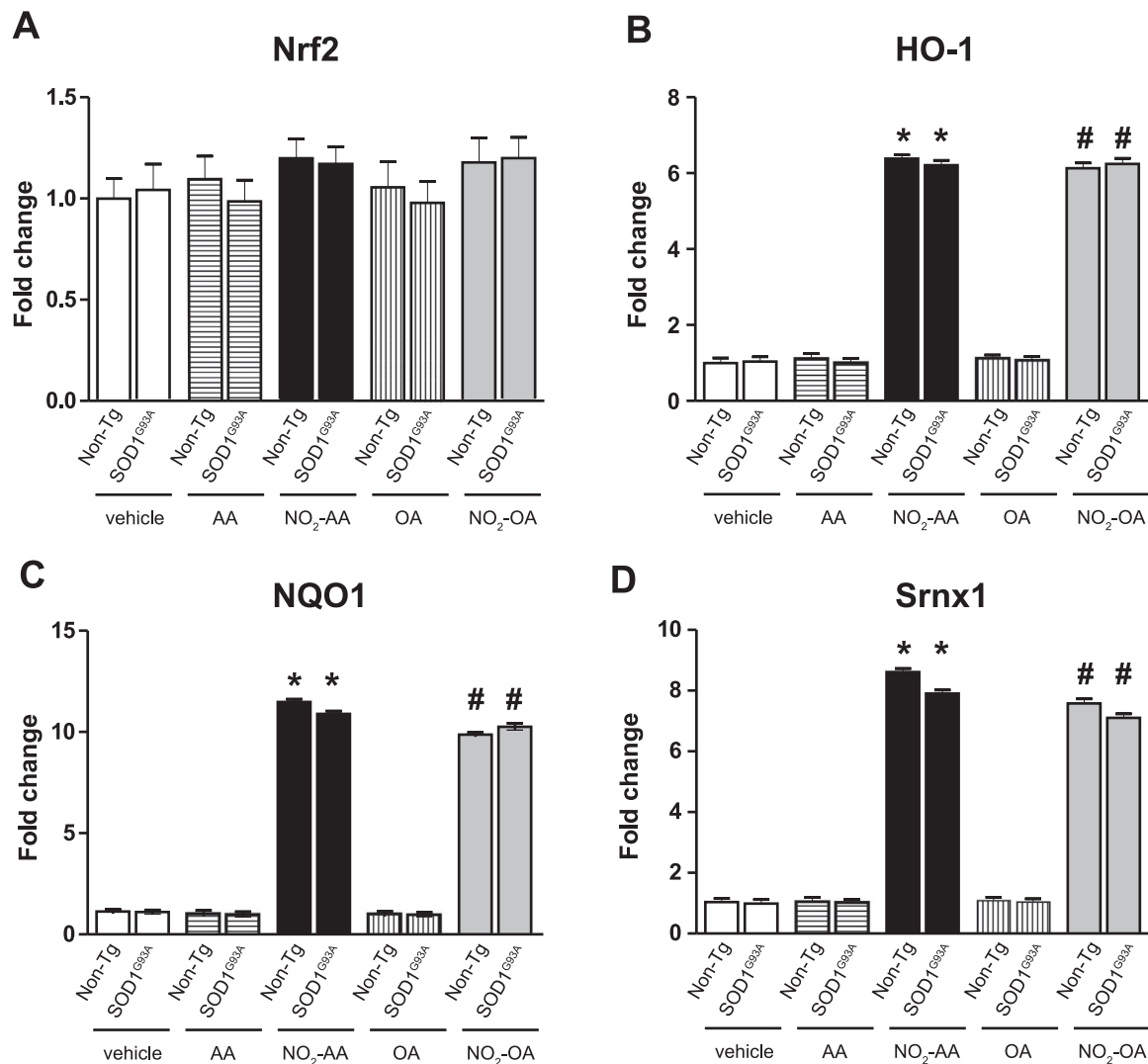
### 3.4. NO<sub>2</sub>-FA inhibit SOD1<sup>G93A</sup> astrocyte-mediated motor neurons death

A feeder layer of SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes decreased the survival of non-Tg motor neurons by 50% compared with a feeder layer of non-Tg astrocytes (Fig. 4A) as previously described [23]. Neuronal survival on top of a feeder layer of non-Tg astrocytes was considered 100% (dotted line in Fig. 4A). Pre-treatment of SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes with either NO<sub>2</sub>-AA or NO<sub>2</sub>-OA before motor neuron plating, prevented motor neuron death induced by SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes (Fig. 4A). Control studies showed no effects of NO<sub>2</sub>-AA on motor neurons survival when added in the absence of astrocytes (not shown). To find out whether the protective effects of NO<sub>2</sub>-FA on SOD1<sup>G93A</sup> astrocyte-mediated motor neuron death were Nrf2-dependent, we used synthetic siRNAs to induce Nrf2 RNA interference (Fig. 4B and C). Transfection of the astrocyte monolayers with Nrf2-siRNA prior to NO<sub>2</sub>-FA treatment abolished the beneficial effect of the treatment on motor neuron survival (Fig. 4C).

## 4. Discussion

Nitro-fatty acids exert pleiotropic anti-inflammatory and adaptive signaling actions, including activation of HO-1 expression in activated macrophages as well as down regulation of nitric oxide synthase 2 (NOS2) expression and inhibition of pro-inflammatory cytokines secretion [32,41,42]. Significant inhibition of NADPH oxidase assembly and superoxide production by activated macrophages also occurs [43]. Moreover, NO<sub>2</sub>-AA is a non-competitive inhibitor of inducible prostaglandin endoperoxide H synthase (PGHS-2) which, in addition to the suppression of NOS2





**Fig. 2.** Phase II antioxidant enzymes are induced by NO<sub>2</sub>-FA in SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes. (A) Nrf2 mRNA levels in both non-Tg and SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes were determined by real-time PCR, in the absence or presence of 5  $\mu$ M NO<sub>2</sub>-AA or NO<sub>2</sub>-OA. Controls with the non-nitrated AA or OA were included. (B–D) Activation of the Nrf2 pathway by nitro-fatty acids was analyzed by real-time PCR and the mRNA levels of HO-1 (A), NQO1 (B) and Srnx1 (C) are shown. Non-Tg and SOD1<sup>G93A</sup> cells were incubated with the 5  $\mu$ M nitrated or non-nitrated fatty acids, as in (A). Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of the fold increase of mRNA respect to vehicle condition,  $n=5$ . \*Significantly different from AA and vehicle ( $p < 0.05$ ); #significantly different from OA and vehicle ( $p < 0.05$ ).

expression after inflammatory stimulus can also contribute to the limitation of inflammatory responses [44,45]. The mechanisms of NO<sub>2</sub>-FA incorporation into cells are currently unknown, but once into cells, NO<sub>2</sub>-FA could activate Nrf2 through electrophilic-mediated reversible nitroalkylation reactions. Nrf2 activity is principally governed by Kelch-like ECH-associating protein 1 (Keap1) a protein with elevated cysteine content, which renders it highly reactive to electrophiles. Villacorta et al. demonstrated a direct reaction of NO<sub>2</sub>-FA with Keap1 impairing Keap1-mediated inhibition of Nrf2/ARE signaling [3].

It is currently unknown whether NO<sub>2</sub>-FA exert actions in neurodegenerative diseases. Herein, we demonstrate a potent protective role of NO<sub>2</sub>-FA on astrocytes expressing the ALS-linked SOD1<sup>G93A</sup> mutation-mediated toxicity to motor neurons. The effects of NO<sub>2</sub>-FA on motor neuron degeneration induced by astrocytes revealed that NO<sub>2</sub>-FA administration to cultured astrocytes caused (a) Nrf2 activation and antioxidant phase II enzymes induction and (b) an increase in total glutathione levels. These effects were independent of changes in Nrf2 mRNA levels. Previous

work has shown that NO<sub>2</sub>-OA exerted potent antioxidant and anti-inflammatory potential through Nrf2 activation [2–4,42,46]. Herein, the involvement of Nrf2 in astrocyte activation was demonstrated by the observed increase in Nrf2 translocation to the nucleus in the presence of NO<sub>2</sub>-FA as well as by a decrease in HO-1 expression when cells were transfected with a negative dominant plasmid and then exposed to NO<sub>2</sub>-AA or NO<sub>2</sub>-OA.

Approximately 10–20% of familial ALS is caused by a toxic gain-of-function induced by mutations of SOD1 [18]. Over-expression of mutated forms of hSOD1 in rodents resulted in animal models of the disease, e.g. hSOD1<sup>G93A</sup> rats [20] or mice [19]. Toxicity to motor neurons requires mutant SOD1 expression in non-neuronal cells as well as in motor neurons [21]. Increased motor neurons HO-1 expression occurs in the spinal cord from ALS patients [47]. We have previously shown that both Nrf2 and HO-1 levels were increased and co-localized with reactive astrocytes in the degenerating lumbar spinal cord of hSOD1<sup>G93A</sup> rats [15]. Herein, we show that HO-1 expression in isolated cultured astrocytes from both transgenic and non-transgenic cells increased following

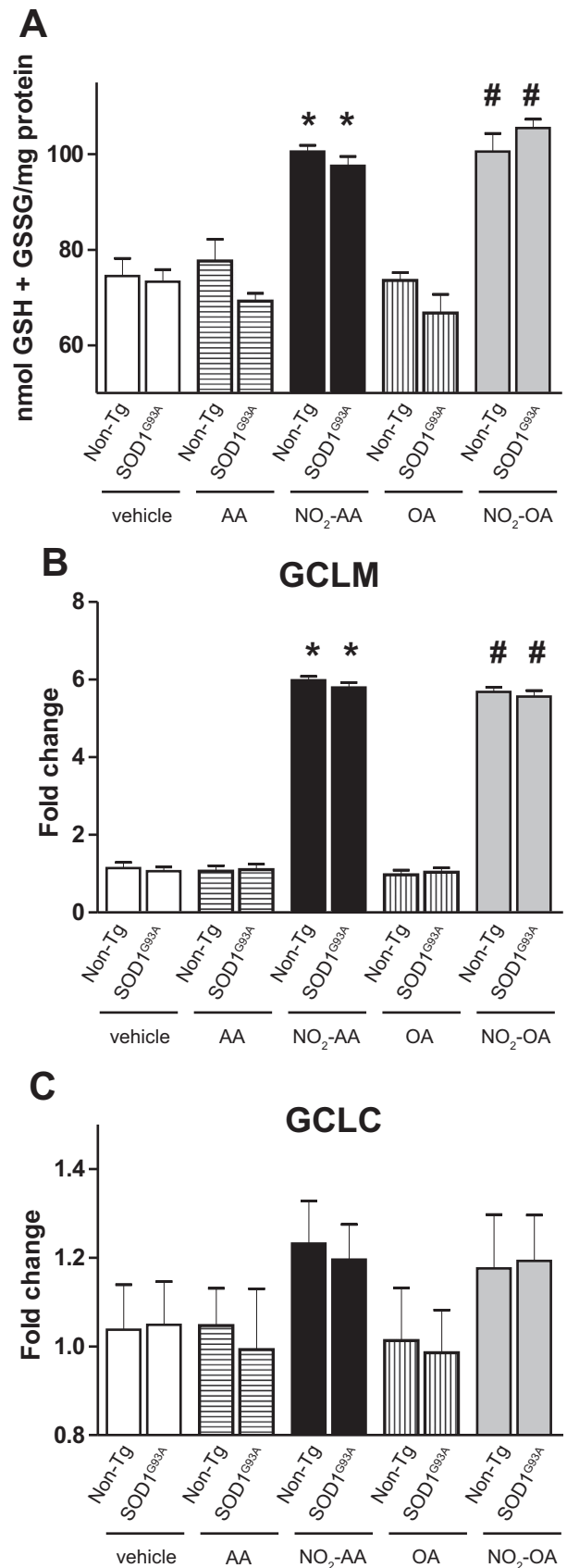
exposure to NO<sub>2</sub>-FA. NQO1 and Srxn1, two other Nrf2-driven genes, were also induced by nitroalkenes in cultured astrocytes. Primary spinal cord astrocyte monolayers support the survival of purified embryonic motor neurons in the absence of added trophic factors [36], where ~50% of motor neurons die when co-cultured with transgenic astrocytes [36]. Thus, the influence of NO<sub>2</sub>-AA or NO<sub>2</sub>-OA applied to astrocytes bearing the SOD1<sup>G93A</sup> mutation on astrocyte-mediated motor neurons death in co-culture conditions was explored. Pre-treatment of SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes with either NO<sub>2</sub>-AA or NO<sub>2</sub>-OA significantly reduced motor neurons loss at low micromolar levels. This effect was prevented by transfecting astrocytes with a Nrf2-siRNA before NO<sub>2</sub>-FA treatment, further supporting that Nrf2 activation is mediating the protective effect of NO<sub>2</sub>-FA. Herein, we also demonstrate that an increase in GSH levels in astrocytes may account for the observed protection of motor neurons death. In fact, when SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes were incubated with either NO<sub>2</sub>-AA or NO<sub>2</sub>-OA, GSH + GSSG levels increased concomitant with an induction of the modulatory subunit of the glutamate-cysteine ligase which catalyzes GSH synthesis.

Besides providing structural and functional support to neurons, neighboring astrocytes also collaborate during the progression of neurological disease displaying high antioxidant capacity [48]. These properties might be due in part to the metabolic interaction between astrocytes and neurons affecting glutathione metabolism. In fact, *de novo* neuronal biosynthesis of GSH depends on the supply of GSH precursors from astrocytes [48]. Increased production and secretion of glutathione by astrocytes is known to protect cocultured neurons from oxidative insults [49]. Moreover, astrocytes are enriched with antioxidant enzymes, such as the ARE-regulated gene HO-1 [50], whose upregulation could protect surrounding neuronal cells from oxidative stress. In addition, enhancing mitochondrial antioxidant defenses in SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes reverts astrocyte-mediated toxicity [34]. Thus the increase in antioxidant defenses induced by the NO<sub>2</sub>-FA treatment could potentially improve mitochondrial function in astrocytes and be partially responsible for the protection observed. These mechanisms may play an important role in NO<sub>2</sub>-FA-triggered astrocyte-mediated increase in motor neuron survival.

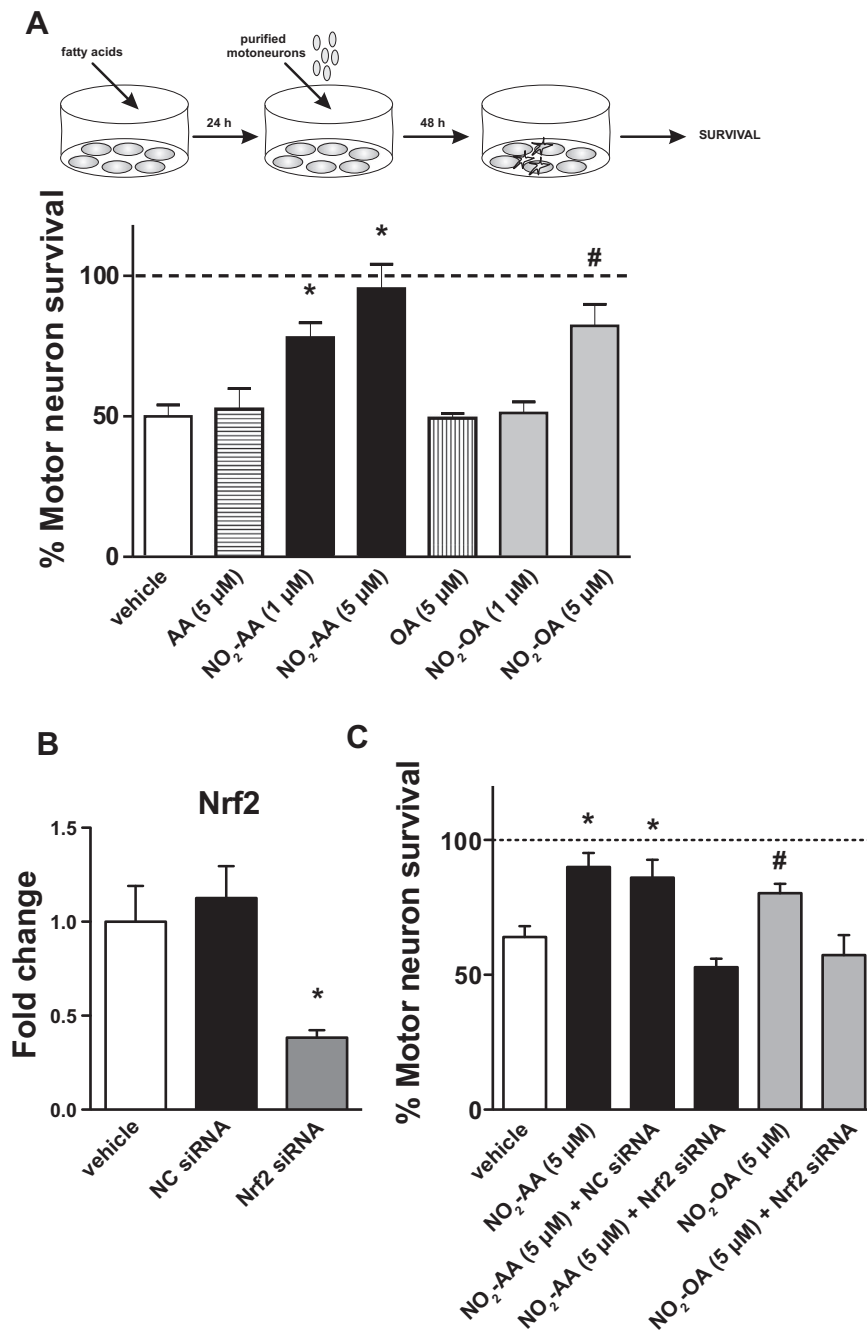
Although the molecular mechanism underlying the selective death of motor neurons in ALS remains unknown, there is strong evidence that the mechanism is non-cell-autonomous, as the expression of mutant SOD1 in neurons affects disease onset, but glial cells, and in particular astrocytes, play a fundamental role in modulating disease progression [51,52]. Herein, we show that NO<sub>2</sub>-FA induces ARE-driven gene expression as well as astrocytic GSH production, and has a significant protective effect against astrocyte-mediated motor neuron death. However, direct stimulatory effects of NO<sub>2</sub>-FA on Nrf2 signaling in motor neurons cannot be discarded with the data presented here and needs further experimentation.

Our results show for the first time that NO<sub>2</sub>-FA induce a potent antioxidant response in astrocytes which is dependent on Nrf2 activation and prevents motor neurons death in a culture model of ALS. Overall, our data not only propose NO<sub>2</sub>-FA as potential novel

therapeutic agents in ALS but also support the role of astrocyte antioxidant defenses in determining motor neuron fate. Considering that the central nervous system is abundant in



**Fig. 3.** NO<sub>2</sub>-FA increase glutathione content in SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes by increasing the Glutamate-cysteine ligase (GCL) modulatory subunit. Non-Tg and SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes were exposed to NO<sub>2</sub>-FA as before. (A) GSH + GSSG content in the cells after 24 h of incubation were analyzed. The mRNA levels of both the modulatory (B) and catalytic (C) subunits of the GCL were analyzed by RT-PCR. Vehicle and non-nitrated fatty acids were included as controls. In all cases, data are expressed as the mean ± SD, n=5. \*Significantly different from AA and vehicle ( $p < 0.05$ ); #significantly different from OA and vehicle ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** NO<sub>2</sub>-FA prevent motor neurons death. (A) Purified Non-Tg motor neurons were plated on top of non-Tg or SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes pre-treated as described above. Treatment of non-Tg astrocytes with NO<sub>2</sub>-AA, NO<sub>2</sub>-OA or tBHQ had no significant effects on motor neuron survival (100%, dotted line). As expected, SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes induced a 50% reduction in motor neuron death respect to non-Tg ones in basal conditions. Motor neuron loss observed in co-culture with SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes was significantly reduced when astrocytes were treated with NO<sub>2</sub>-AA or NO<sub>2</sub>-OA for 24 h before motor neuron plating. Controls with the non-nitrated fatty acids were included without any effect in the survival of the motor neuron cells. \*Significantly different from vehicle and AA ( $p < 0.05$ ); #significantly different from vehicle and OA ( $p < 0.05$ ). (B) Nrf2 mRNA levels in astrocytes treated with Nrf2-siRNA were determined by real-time PCR. A siRNA that does not target any sequence in the transcriptome was included as negative control (NC siRNA). \*Significantly different from vehicle and NC siRNA ( $p < 0.05$ ). (C) Motor neuron survival on a feeder layer of SOD1<sup>G93A</sup> astrocytes treated with NO<sub>2</sub>-FA following a pre-treatment with Nrf2-siRNA or NC-siRNA (negative control). Nrf2-siRNA pre-treatment abolished the beneficial effects of NO<sub>2</sub>-FA on motor neuron survival. \*Significantly different from vehicle and NO<sub>2</sub>-AA + Nrf2-siRNA ( $p < 0.05$ ); #significantly different from vehicle and NO<sub>2</sub>-OA + Nrf2-siRNA ( $p < 0.05$ ). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments.

polyunsaturated fatty acids, it is possible that NO<sub>2</sub>-FA being generate as adaptive response during inflammatory conditions to protect motor neurons by the mechanisms reported here. Current work is focusing on demonstrate the neuroprotective role of NO<sub>2</sub>-FA by their ability to cross the brain blood barrier and extend the survival of ALS-linked mutant SOD1<sup>G93A</sup> mice.

#### Acknowledgments

This work was partially supported by grants from CSIC-Uruguay (HR) (PC); NIH grants R01-HL058115, R01-HL64937, P30-DK072506, P01-HL103455 (BAF) and NIH grants ES019186 and NS089640 (MRV).

## References

- [1] H. Rubbo, R. Radi, M. Trujillo, R. Telleri, B. Kalyanaraman, S. Barnes, M. Kirk, B. A. Freeman, Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 26066–26075.
- [2] E. Kansanen, H.K. Jyrkkänen, O.L. Volger, H. Leinonen, A.M. Kivela, S. K. Hakkinen, S.R. Woodcock, F.J. Schopfer, A.J. Horrevoets, S. Yla-Herttuala, B. A. Freeman, A.L. Levonen, Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 33233–33241.
- [3] L. Villacorta, J. Zhang, M.T. Garcia-Barrio, X.L. Chen, B.A. Freeman, Y.E. Chen, T. Cui, Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293 (2007) H770–H776.
- [4] E. Kansanen, G. Bonacci, F.J. Schopfer, S.M. Kuosmanen, K.I. Tong, H. Leinonen, S.R. Woodcock, M. Yamamoto, C. Carlberg, S. Yla-Herttuala, B.A. Freeman, A. L. Levonen, Electrophilic Nitro-fatty Acids Activate NRF2 by a KEAP1 Cysteine 151-independent Mechanism, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 14019–14027.
- [5] D.D. Zhang, Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway, *Drug Metab. Rev.* 38 (2006) 769–789.
- [6] T.W. Kensler, N. Wakabayashi, S. Biswal, Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47 (2007) 89–116.
- [7] H.M. Schipper, Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 1995–2011.
- [8] S. Dore, M. Takahashi, C.D. Ferris, R. Zakhary, L.D. Hester, D. Guastella, S. H. Snyder, Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 2445–2450.
- [9] M.D. Maines, G.M. Trakshel, R.K. Kutty, Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 411–419.
- [10] K.D. Poss, S. Tonegawa, Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 10925–10930.
- [11] A. Yachie, Y. Niida, T. Wada, N. Igarashi, H. Kaneda, T. Toma, K. Ohta, Y. Kasahara, S. Koizumi, Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 129–135.
- [12] B.E. Dwyer, R.N. Nishimura, J. De Vellis, T. Yoshida, Heme oxygenase is a heat shock protein and PEST protein in rat astroglial cells, *Glia* 5 (1992) 300–305.
- [13] H.M. Schipper, L. Bernier, K. Mehindate, D. Frankel, Mitochondrial iron sequestration in dopamine-challenged astroglia: role of heme oxygenase-1 and the permeability transition pore, *J. Neurochem.* 72 (1999) 1802–1811.
- [14] K. Mehindate, D.J. Sahlas, D. Frankel, Y. Mawal, A. Liberman, J. Corcos, S. Dion, H.M. Schipper, Proinflammatory cytokines promote glial heme oxygenase-1 expression and mitochondrial iron deposition: implications for multiple sclerosis, *J. Neurochem.* 77 (2001) 1386–1395.
- [15] M.R. Vargas, M. Pehar, P. Cassina, L. Martinez-Palma, J.A. Thompson, J. S. Beckman, L. Barbeito, 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, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 25571–25579.
- [16] A. Takeda, Y. Itoyama, T. Kimpara, X. Zhu, J. Avila, B.E. Dwyer, G. Perry, M. A. Smith, Heme catabolism and heme oxygenase in neurodegenerative disease, *Antioxid. Redox Signal.* 6 (2004) 888–894.
- [17] L.P. Rowland, N.A. Shneider, Amyotrophic lateral sclerosis, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 1688–1700.
- [18] D.R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, D.A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J.P. O'Regan, H.X. Deng, et al., Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, *Nature* 362 (1993) 59–62.
- [19] M.E. Gurney, H. Pu, A.Y. Chiu, M.C. Dal Canto, C.Y. Polchow, D.D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y.W. Kwon, H.X. Deng, et al., Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation, *Science* 264 (1994) 1772–1775.
- [20] D.S. Howland, J. Liu, Y. She, B. Goad, N.J. Maragakis, B. Kim, J. Erickson, J. Kulik, L. DeVito, G. Psaltis, L.J. DeGennaro, D.W. Cleveland, J.D. Rothstein, Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 1604–1609.
- [21] A.M. Clement, M.D. Nguyen, E.A. Roberts, M.L. Garcia, S. Boillee, M. Rule, A. P. McMahon, W. Doucette, D. Siwek, R.J. Ferrante, R.H. Brown Jr., J.P. Julien, L. S. Goldstein, D.W. Cleveland, Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice, *Science* 302 (2003) 113–117.
- [22] L.H. Barbeito, M. Pehar, P. Cassina, M.R. Vargas, H. Peluffo, L. Viera, A. G. Estevez, J.S. Beckman, A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis, *Brain* 127 (2004) 263–274.
- [23] M.R. Vargas, M. Pehar, P. Cassina, J.S. Beckman, L. Barbeito, Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis, *J. Neurochem.* 97 (2006) 687–696.
- [24] M. Nagai, D.B. Re, T. Nagata, A. Chalazonitis, T.M. Jessell, H. Wichterle, S. Przedborski, Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons, *Nat. Neurosci.* 10 (2007) 615–622.
- [25] M. Pehar, P. Cassina, M.R. Vargas, R. Castellanos, L. Viera, J.S. Beckman, A. G. Estevez, L. Barbeito, Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurochem.* 89 (2004) 464–473.
- [26] P. Cassina, M. Pehar, M.R. Vargas, R. Castellanos, A.G. Barbeito, A.G. Estevez, J. A. Thompson, J.S. Beckman, L. Barbeito, Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurochem.* 93 (2005) 38–46.
- [27] K. Yamanaka, S.J. Chun, S. Boillee, N. Fujimori-Tonou, H. Yamashita, D. H. Gutmann, R. Takahashi, H. Misawa, D.W. Cleveland, Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis, *Nat. Neurosci.* 11 (2008) 251–253.
- [28] M.R. Vargas, J.A. Johnson, Astroglial in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes, *Neurotherapeutics* 7 (2010) 471–481.
- [29] M. Pehar, M.R. Vargas, K.M. Robinson, P. Cassina, P.J. Diaz-Amarilla, T. M. Hagen, R. Radi, L. Barbeito, J.S. Beckman, Mitochondrial superoxide production and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation in p75 neurotrophin receptor-induced motor neuron apoptosis, *J. Neurosci.* 27 (2007) 7777–7785.
- [30] M.R. Vargas, D.A. Johnson, D.W. Sirkis, A. Messing, J.A. Johnson, Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurosci.* 28 (2008) 13574–13581.
- [31] M.J. Calkins, D.A. Johnson, J.A. Townsend, M.R. Vargas, J.A. Dowell, T. P. Williamson, A.D. Kraft, J.M. Lee, J. Li, J.A. Johnson, The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 497–508.
- [32] A. Trostchansky, J.M. Souza, A. Ferreira, M. Ferrari, F. Blanco, M. Trujillo, D. Castro, H. Cerecetto, P.R. Baker, V.B. O'Donnell, H. Rubbo, Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate, *Biochemistry* 46 (2007) 4645–4653.
- [33] P.R. Baker, Y. Lin, F.J. Schopfer, S.R. Woodcock, A.L. Groeger, C. Batthyany, S. Sweeney, M.H. Long, K.E. Iles, L.M. Baker, B.P. Branchaud, Y.E. Chen, B. A. Freeman, Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 42464–42475.
- [34] P. Cassina, A. Cassina, M. Pehar, R. Castellanos, M. Gandelman, A. de Leon, K. M. Robinson, R.P. Mason, J.S. Beckman, L. Barbeito, R. Radi, Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants, *J. Neurosci.* 28 (2008) 4115–4122.
- [35] E. Miquel, A. Cassina, L. Martinez-Palma, C. Bolatto, E. Trias, M. Gandelman, R. Radi, L. Barbeito, P. Cassina, Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis, *PLoS ONE* 7 (2012) e34776.
- [36] P. Cassina, H. Peluffo, M. Pehar, L. Martinez-Palma, A. Ressler, J.S. Beckman, A. G. Estevez, L. Barbeito, Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis, *J. Neurosci. Res.* 67 (2002) 21–29.
- [37] M. Pehar, G. Beeson, C.C. Beeson, J.A. Johnson, M.R. Vargas, Mitochondria-targeted catalase reverts the neurotoxicity of hSOD1G(9)(3)A astrocytes without extending the survival of ALS-linked mutant hSOD1 mice, *PLoS One* 9 (2014) e103438.
- [38] C.E. Henderson, E. Bloch-Gallego, W. Camu, Purification and culture of embryonic motoneurons, 1995.
- [39] J. Alam, D. Stewart, C. Touchard, S. Boinapally, A.M. Choi, J.L. Cook, Nrf2, a Cap'n/Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 26071–26078.
- [40] E. Schreiber, P. Matthias, M.M. Muller, W. Schaffner, Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 6419.
- [41] A. Trostchansky, H. Rubbo, Nitrated fatty acids: mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 1887–1896.
- [42] A.M. Ferreira, M.I. Ferrari, A. Trostchansky, C. Batthyany, J.M. Souza, M. N. Alvarez, G.V. Lopez, P.R. Baker, F.J. Schopfer, V. O'Donnell, B.A. Freeman, H. Rubbo, Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrooleate, *Biochem. J.* 417 (2009) 223–234.
- [43] L. Gonzalez-Perilli, M.N. Alvarez, C. Prolo, R. Radi, H. Rubbo, A. Trostchansky, Nitroarachidonic acid prevents NADPH oxidase assembly and superoxide radical production in activated macrophages, *Free Radic. Biol. Med.* 58 (2013) 126–133.
- [44] A. Trostchansky, L. Bonilla, C.P. Thomas, V.B. O'Donnell, L.J. Marnett, R. Radi, H. Rubbo, Nitroarachidonic acid, a novel peroxidase inhibitor of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 12891–12900.
- [45] L. Bonilla, V.B. O'Donnell, S.R. Clark, H. Rubbo, A. Trostchansky, Regulation of protein kinase C by nitroarachidonic acid: impact on human platelet activation, *Arch. Biochem. Biophys.* 533 (2013) 55–61.
- [46] T. Tsujita, L. Li, H. Nakajima, N. Iwamoto, Y. Nakajima-Takagi, K. Ohashi, K. Kawakami, Y. Kumagai, B.A. Freeman, M. Yamamoto, M. Kobayashi, Nitro-fatty acids and cyclopentenone prostaglandins share strategies to activate the Keap1-Nrf2 system: a study using green fluorescent protein transgenic zebrafish, *Genes Cells* 16 (2011) 46–57.
- [47] R.J. Ferrante, S.E. Browne, L.A. Shinobu, A.C. Bowling, M.J. Baik, U. MacGarvey, N.W. Kowall, R.H. Brown Jr., M.F. Beal, Evidence of increased oxidative damage

- in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurochem.* 69 (1997) 2064–2074.
- [48] S. Fernandez-Fernandez, A. Almeida, J.P. Bolanos, Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes, *Biochem. J.* 443 (2012) 3–11.
- [49] R. Dringen, J.M. Gutterer, J. Hirrlinger, Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 4912–4916.
- [50] M.R. Vargas, J.A. Johnson, The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes, *Expert Rev. Mol. Med.* 11 (2009) e17.
- [51] S. Boillee, K. Yamanaka, C.S. Lobsiger, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, G. Kassiotis, G. Kollias, D.W. Cleveland, Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia, *Science* 312 (2006) 1389–1392.
- [52] K. Yamanaka, S. Boillee, E.A. Roberts, M.L. Garcia, M. McAlonis-Downes, O. R. Mikse, D.W. Cleveland, L.S. Goldstein, Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 7594–7599.

## CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN EXOSOMAL DE ASTROCITOS SOD1G93A

### INTRODUCCIÓN Y RACIONAL DEL ESTUDIO

Los astrocitos que expresan SOD1G93A y otras mutaciones vinculadas a ELA inducen la muerte de motoneuronas en cultivo. La capacidad neurotóxica está presente en los medios condicionados de astrocitos, sin embargo a pesar de los múltiples reportes aún no se ha establecido claramente el mecanismo por el cual los astrocitos inducen la muerte de motoneuronas (Van Harten et al., 2021).

La idea principal detrás del trabajo de este capítulo fue estudiar la posibilidad de que el mecanismo de toxicidad esté mediado por biomoléculas contenidas en vesículas extracelulares.

La producción y composición de los exosomas de astrocitos es alterada en diversas situaciones patológicas (Gharbi et al., 2020). Por ejemplo, los astrocitos en el modelo de ELA SOD1G93A muestran un aumento en la liberación de exosomas y transportan la proteína humana SOD1G93A a las motoneuronas (Basso et al., 2013). Y frente a un estímulo trófico como el ATP o antiinflamatorio como IL-10 liberan vesículas con proteínas que estimulan el crecimiento dendrítico y sinaptogénesis, mientras que frente a un estímulo inflamatorio como IL-1  $\beta$  liberan vesículas con proteínas que regulan la respuesta inmunitaria y reclutamiento celular (Datta Chaudhuri et al., 2020). Estos datos proponen a la vía de señalización exosomal como un posible candidato para la modulación de la toxicidad mediada por astrocitos en la ELA.

### OBJETIVO

El objetivo del presente capítulo de este trabajo de Tesis consiste en analizar la fracción de vesículas extracelulares astrocitarias como potencial mediador de la interacción astrocito-motoneurona. Evaluar su participación en el mantenimiento de la supervivencia de motoneuronas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *MATERIALES*

Todos los medios de cultivo y suero fueron adquiridos en Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las placas y frascos de cultivo son Nunc (Thermo Fisher Scientific). El resto de los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Merck) a no ser que se especifique lo contrario.

### *CONSIDERACIONES ÉTICAS*

Los procedimientos que implicaron la utilización de animales se realizaron siguiendo las pautas internacionales y aprobados por la Comisión honoraria de experimentación animal de la Universidad de la República <http://www.chea.csic.edu.uy>; CHEA), protocolo #1038.

### *ANIMALES*

Las ratas (*Rattus norvegicus*) y ratones (*Mus musculus*) se alojaron en un ambiente controlado (ciclo luz-oscuridad de 12 horas;  $20 \pm 1$  °C), con acceso al alimento y agua *ad libitum*. No más de seis hembras o machos por jaula.

Las ratas macho transgénicas hemicigotas NTac: SD-Tg (SOD1G93A) L26H fueron adquiridas de Taconic (Hudson, NY, USA) y se cruzaron con ratas Sprague–Dawley. Los neonatos se genotiparon por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como fue descrito previamente (Howland et al., 2002).

Los ratones transgénicos portadores de la SOD1 humana con mutación G93A, cepa B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur (Gurney et al., 1994), fueron adquiridos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). La cepa se mantuvo por cruzamiento de machos portadores hemicigotas con hembras B6SJLF1. Las crías se genotiparon por PCR como se describió previamente. Para los estudios se utilizaron animales hemicigotas para el SOD1G93A y sus compañeros de camada no Tg.

### *CULTIVOS DE ASTROCITOS*

Los cultivos de astrocitos corticales y espinales fueron realizados partiendo de neonatos de rata SOD1G93A o no Tg, genotipados por PCR, de acuerdo al protocolo de Saneto and De Vellis (Saneto & De Vellis, 1987) con leves modificaciones (Cassina et al., 2002). Brevemente, se disecó la corteza

cerebral o la médula espinal, removiendo cuidadosamente las meninges y el tejido fue cortado en pequeños pedazos con bisturí y disociado enzimáticamente con 0.25% tripsina-EDTA por 25 min a 37 °C. La tripsinización se detuvo con medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), de alta glucosa (4,5 g/l), suplementado con HEPES (3,6 g/l), penicilina (100 IU/mL), streptomycin (100 mg/mL), y 10% (v/v) suero bovino fetal (FBS). Se adicionó ADNasa I (50 µg/mL) y se disgregó mecánicamente utilizando una micropipeta de 1000 µL. La suspensión celular se pasó por una malla de 80-µm y se centrifugó por 10 min a 300 x g. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio DMEM suplementado y se plaquearon a una densidad  $1,5 \times 10^6$  células por frasco de 25-cm<sup>2</sup>. Tras cambios de medio cada 48-72 h, al alcanzar confluencia los cultivos se agitaron por 48 h a 400 rpm, y luego fueron tratados por 48 h con arabinósido de citosina (Ara-C) para eliminar células que sigan proliferando (fundamentalmente microglía contaminante). Finalmente, los cultivos purificados de astrocitos se amplificaron mediante su tripsinización y plaqueo a menor densidad ya sea nuevamente en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, en placas de Petri de 35 mm o en placas de 24 o 4 pocillos (a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>). Los cultivos se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% SFB (s-DMEM). Al cabo de una semana los astrocitos forman monocapas confluentes y se encuentran listos para ser tratados o para producción de exosomas.

#### *CULTIVOS DE MOTONEURONAS*

Los cultivos enriquecidos en motoneuronas espinales se obtuvieron a partir de embriones de 15 días (E15) de ratas Wistar mediante una combinación de centrifugación diferencial e inmunoselección de acuerdo al procedimiento descrito en (Henderson et al., 1995) con algunas modificaciones (Cassina et al., 2002). Brevemente, las médulas fueron disecadas, se removieron sus meninges y se aisló la región ventral de la médula separándola del asta dorsal con bisturí. Las regiones ventrales fueron fraccionadas y tripsinizadas en buffer fosfato salino (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) en presencia de 0,02% tripsina durante 12 minutos a 37 °C. El proceso de tripsinización se detuvo por el agregado de medio de cultivo L15 completo (L15 de Leibovitz suplementado con: bicarbonato de sodio (22 mM), glucosa (20 mM), insulina (5 µg/mL), progesterona (21 nM), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL), suero de caballo (2%) y 0,1% seroalbúmina bovina (BSA)). Seguidamente se procedió a la disociación mecánica del tejido en presencia de 0,02 mg/mL de DNasa-1 en medio L15 completo, las células se separaron del detrito por centrifugación sobre un colchón de BSA (4%, 300g, 10 minutos). El precipitado celular fue resuspendido y sometido a una centrifugación diferencial sobre un colchón de Optiprep (1:10 en L15, 800g, 15 minutos). Este paso enriquece en motoneuronas la fracción en la interfase medio – optiprep



(>70%). Posteriormente se realizó un paso adicional de purificación mediante inmunoafinidad empleando un anticuerpo monoclonal contra el receptor de neurotrofinas P75 (sobrenadante de hibridoma IgG192), en donde la suspensión celular se incubó 1 hora en placas de bacteriología pretratadas con este anticuerpo. Las células no adherentes fueron desechadas y las motoneuronas adheridas se eluyeron por lavado con sobrenadante de hibridoma IgG192. Finalmente, las motoneuronas fueron colectadas por centrifugación en un colchón de BSA. Se plaquearon a una densidad de 300 células/cm<sup>2</sup> sobre monocapas de astrocitos espinales confluentes en medio L15 completo, o sobre un sustrato de poliornitina-laminina y cultivadas en medio Neurobasal. Los cultivos puros de motoneuronas se suplementaron con 1 ng/mL de GDNF (*glial cell-derived neurotrophic factor*) como se describió previamente (Cassina et al., 2002).

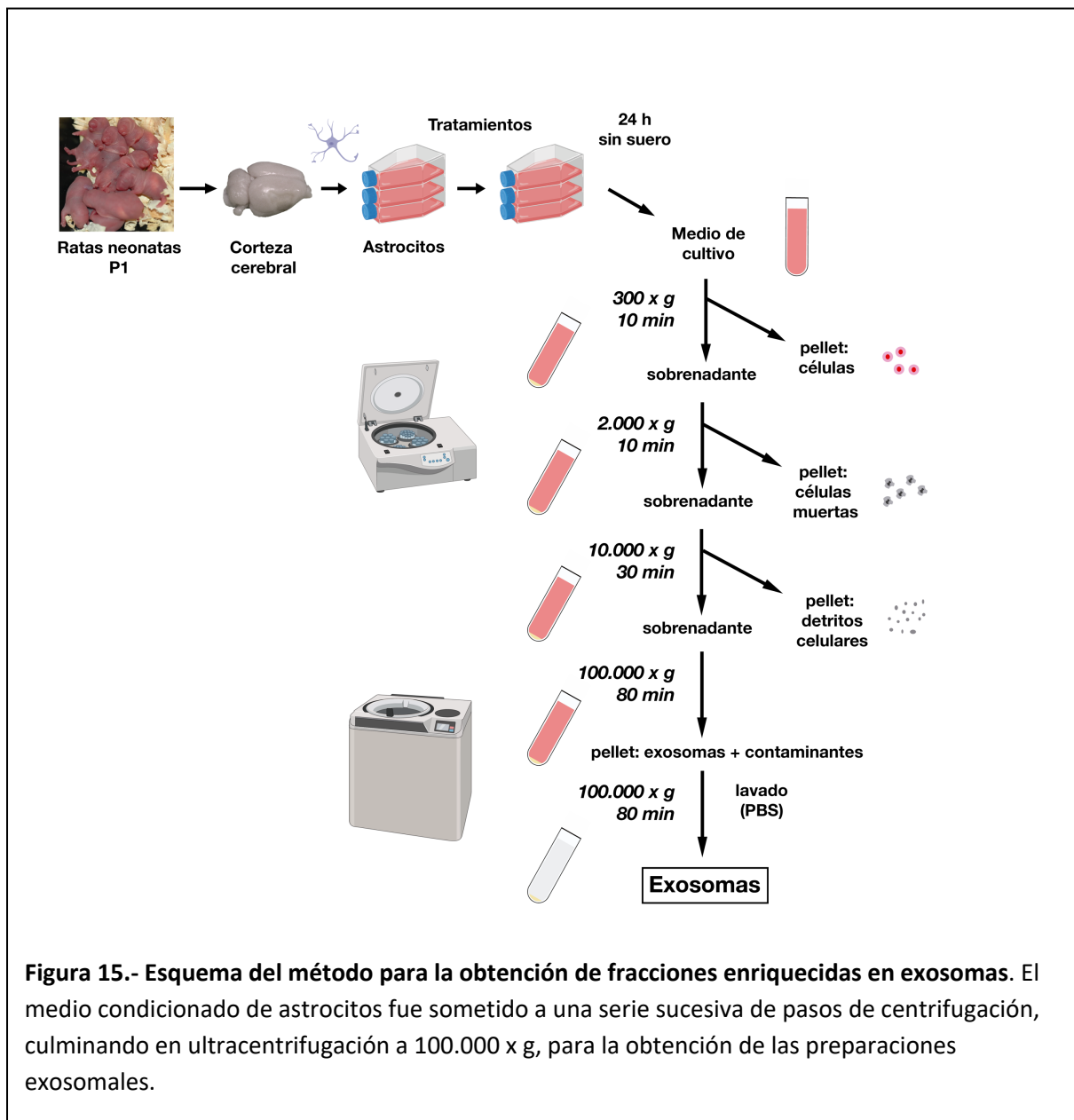
#### *CULTIVOS DE CÉLULAS GLIALES ABERRANTES (ABGCs)*

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 cm<sup>2</sup>. El s-DMEM se reemplazó cada 48 h 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 x10<sup>6</sup> células por 25 cm<sup>2</sup>) cada semana. En los experimentos se utilizaron AbGCs de 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.

#### *OBTENCIÓN DE EXOSOMAS*

Cultivos puros de astrocitos corticales en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> se lavaron 2 veces con PBS y fueron incubados en DMEM sin suero. Luego de 48 h, se colectó el medio condicionado y se procedió al aislamiento de exosomas. Las preparaciones enriquecidas en exosomas se obtuvieron por ultracentrifugación diferencial siguiendo protocolos descritos previamente (Théry et al., 2006) con algunas modificaciones (Figura 15). Se realizaron tres centrifugaciones y resuspensiones del precipitado sucesivas a 300 x g (10 min), 2000 x g (10 min), y 10000 x g (30 min) para eliminar células

vivas, muertas y restos celulares respectivamente. Se guardó una muestra del sobrenadante de la centrifugación a 10000 x g como medio condicionado (MC). A continuación, se realizó ultracentrifugación a 100000 x g por 80 min. El sobrenadante se guardó como MC libre de exosomas. El precipitado conteniendo exosomas se resuspendió en PBS y centrifugó nuevamente a 100.000 x g por 80 min. Finalmente, el precipitado final se resuspendió en 30 µl de PBS o, en el caso de las muestras para western blot, de un buffer de lisis compuesto por Tris-HCl 25 mM pH 7.6 + 2 mM EDTA., 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% Nonidet P-40, y cóctel inhibidor de proteasas (Sigma).



### *TRATAMIENTO DE MOTONEURONAS Y CONTEO*

Tras 24 h en cultivo en placas de cuatro pocillos en medio neurobasal con GDNF, las motoneuronas fueron tratadas con MC de astrocitos (dilución 1:10 o 1:100), MC libre de exosomas, o exosomas a una concentración basada en el factor de dilución de la preparación exosomal, restaurando la concentración de exosomas que habría en el MC. 48 h luego de los tratamientos, las neuronas se fijaron con paraformaldehído al 4% + glutaraldehído al 0,1% y se realizó inmunocitoquímica con anticuerpos contra BIII-tubulina (1:3000) para facilitar la visualización de las células. El revelado se realizó utilizando como sustrato una solución de diaminobencidina – peróxido de hidrógeno. La supervivencia neuronal se determinó por conteo directo de todas las neuronas que presentaban por lo menos una neurita de una longitud superior a 4 diámetros del cuerpo celular.

### *WESTERN BLOT*

Muestras de proteínas exosomales en buffer de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 7.6 + 2 mM EDTA., 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% Nonidet P-40, y cóctel inhibidor de proteasas (sigma)) fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con 5% BSA en PBS por 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios disueltos en PBS + 5% BSA + 0,1% tween-20, luego lavados con PBS + 0,1% tween-20, se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios y nuevamente lavados en PBS + 0,1% tween-20. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti TNF- $\alpha$  (conejo, 1:500, Abcam #ab6671), anti Flotillin-1 (ratón, 1:500, BD Transduction Laboratories #610820), anti ROCK2 (ratón, 1:10000, Abcam #ab125025), anti TSG101 (conejo, 1:1000, Abcam #ab125011), anti nitro-NGF (ratón, 1:200, producido por el Laboratorio de Neurodegeneración, Institut Pasteur de Montevideo, #12G8), anti CD40L (conejo, 1:500, Abcam #ab2391), anti SOD humana (conejo, 1:200, abcam #ab52950), anti LCN2 (conejo, 1:500, abcam #ab63929) anti VDAC1 (ratón, 1:1000, abcam #ab14734), anti-S100B (conejo, 1:1000, NovusBio #NB110-57478), anti-S100B (conejo, 1:500, Santa Cruz #sc-28533), anti tubulin (conejo, 1:200, Sigma #T3526), anti-Fas-L (conejo, 1:200, abcam # ab15285), anti CD9 (ratón, 1:800, BD Pharmingen # 551808), anti  $\beta$ -actina (ratón, 1:4000; Sigma-Aldrich # A5441). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG antibody (LI-COR Biosciences #926-32210), IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG antibody (LI-COR Biosciences #926-68070), IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG antibody (LI-COR Biosciences # 926-32211), IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG antibody (LI-COR Biosciences #925-68071). La detección y cuantificación se realizó utilizando el Sistema LI-COR Odyssey y el software incluido.

### *MICROSCOPIA ELECTRÓNICA*

Las fracciones enriquecidas en exosomas se procesaron para microscopía electrónica por el método de tinción negativa con acetato de uranilo al 2% en la Unidad de Microscopía Electrónica de Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Brevemente, se agregaron 10  $\mu$ L de la suspensión exosomal sobre una grilla de microscopía electrónica cubierta de film de carbono (Electron Microscopy Sciences), se incubó por 15 min y el exceso de líquido se eliminó absorbiendo lateralmente con papel de filtro. Las muestras luego se incubaron por 5 min con acetato de uranilo al 2%, removiendo el exceso de líquido nuevamente, y se dejaron secar completamente antes de visualizar al microscopio electrónico. La observación se realizó utilizando un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM1010 operado a 100 kV y equipado con una cámara digital HAMAMATSU C-4742-95 y el software AMT Advantage. El diámetro de los exosomas se midió en las micrografías electrónicas utilizando el software ImageJ.

### *PROTEÓMICA*

Fracciones exosomales de astrocitos no Tg y SOD1G93A fueron preparadas como se describió previamente a partir de 100 mL de medio condicionado de astrocitos y resuspendidas en 30  $\mu$ L de Urea 8M. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su posterior digestión con tripsina y procesamiento para espectrometría de masa. El procesamiento por cromatografía líquida – espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS) fue realizado gracias a una colaboración con la Dra. Mariana Pehar, de la Medical University of South Carolina, EEUU, en la Unidad de espectrometría de masa del instituto. Las muestras se procesaron con un espectrómetro de masa Thermo Scientific Orbitrap Elite acoplado a un Easy 1200 nano-UHPLC. La identificación de proteínas, cuantificación y análisis estadístico se realizó con el software MaxQuant (Max Planck Institute), comparando contra bases de datos de proteínas de rata y de humano (base de datos SwissProt/TrEMBL).

### *ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA Y PROGRESIÓN DE SÍNTOMAS EN RATONES*

Grupos de ratones hembras SOD1G93A y sus compañeros de camada no Tg fueron tratados con el inhibidor de producción de exosomas GW4869 (SIGMA) para analizar su efecto en la progresión de síntomas. La administración se realizó por vía intraperitoneal, a una dosis de 2,5  $\mu$ g/g de GW4869 en DMSO 3,75% en Salina normal (NaCl 0,9%) de acuerdo a lo utilizado en otros estudios (Essandoh et al., 2015) o vehículo, 3 veces/semana. Los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (n= 6

por grupo): no Tg + vehículo, SOD1G93A + vehículo, no Tg + GW4869, SOD1G93A + GW4869. El tratamiento comenzó a los 70 días de vida (etapa pre-sintomática) y continuó hasta la muerte. Se observó a los animales 3 veces por semana para controlar el peso, inicio de los síntomas, progresión de la enfermedad y constatar muerte. El inicio de síntomas se definió como la primera observación de una extensión anormal de los miembros posteriores al levantar el animal. El punto final se definió como la completa parálisis de ambos miembros posteriores y la incapacidad de los animales de incorporarse luego de ser dispuestos sobre su costado. La progresión de los síntomas motores se evaluó con la prueba de rotarod (utilizando el equipo letica rota-rod le 8200), evaluando la performance dos veces por semana desde el inicio del ensayo hasta la finalización del estudio.

### *ESTADÍSTICA*

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Graphpad Prism 9. Los datos se presentaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de valores obtenidos en al menos 3 experimentos independientes realizados en triplicado. Las curvas de supervivencia fueron comparadas mediante análisis de Kaplan-Meier con el test Log-rank. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. La significancia estadística se definió a  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### *CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN EXOSOMAL DE ASTROCITOS*

Para comenzar el trabajo de estudio del rol de los exosomas de astrocitos en la muerte neuronal en la ELA, nuestra primera meta fue la puesta a punto de un método para el aislamiento y obtención de exosomas a partir de medio condicionado de astrocitos en cultivo.

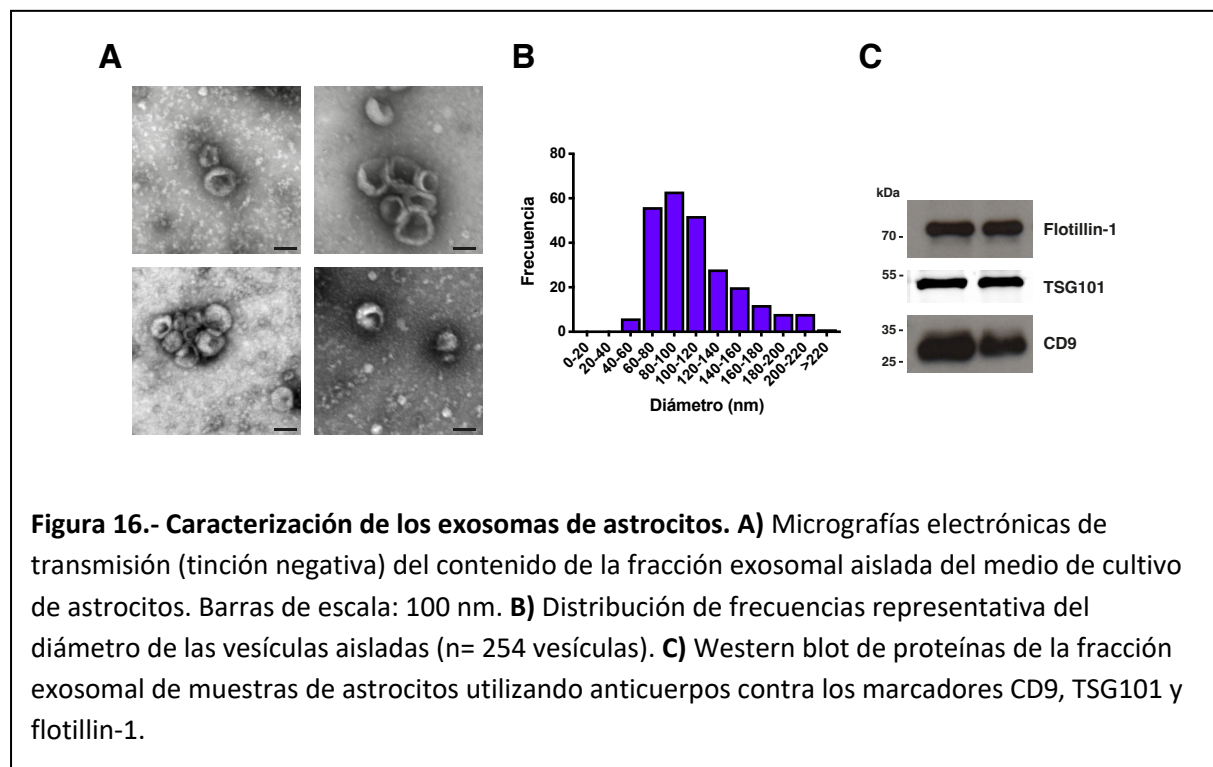
Existen diversos métodos para el aislamiento de vesículas extracelulares y específicamente exosomas a partir de fluidos corporales y medios de cultivo celular. El más ampliamente utilizado es el método de ultracentrifugación diferencial, pero existen otras técnicas como la ultrafiltración, la utilización de agentes precipitadores poli-etilén glycol (PEG), captura de inmunofinidad, microfluídica, y cromatografía de exclusión de tamaño (Sidhom et al., 2020). Cada método tiene sus ventajas y desventajas, considerando pureza, velocidad, rendimiento, precio y escalabilidad. Para este trabajo

optamos por el método de ultracentrifugación diferencial, que permite purificar estas vesículas extracelulares basándose en su tamaño y densidad. En la Figura 15 se muestra un esquema del método de obtención.

Una de las principales dificultades de trabajar con exosomas de células de cultivos primarios es lograr conseguir una masa crítica de células y volumen de medio de cultivo suficiente para aislar una muestra que permita su análisis o ensayar sus efectos.

Una vez obtenida la muestra se procedió a su caracterización por microscopía electrónica de transmisión y western blot contra proteínas características. La fracción de vesículas extracelulares aisladas por ultracentrifugación diferencial (100.000 x g como paso final) del medio condicionado de astrocitos en cultivo presentó las características de tamaño y densidad compatibles con una fracción enriquecida en exosomas. Al visualizarse al microscopio electrónico por tinción negativa se presentan como vesículas con forma de copa (Figura 16A). Al establecer las medidas de sus diámetros se observa que el 77% de las vesículas presentes en las imágenes tiene un diámetro que oscilan entre 60-100 nm, con una mediana de 100,2 nm de diámetro (Figura 16B).

Para continuar con la caracterización de la muestra se analizó la presencia de proteínas específicas de vesículas extracelulares. Encontramos que expresan la proteína de vesículas extracelulares pequeñas CD9, utilizado como marcador de exosomas hasta hace poco tiempo (Mathieu et al., 2021) y además las proteínas específicas de exosomas, flotilina-1 y TSG101 (Figura 16C).

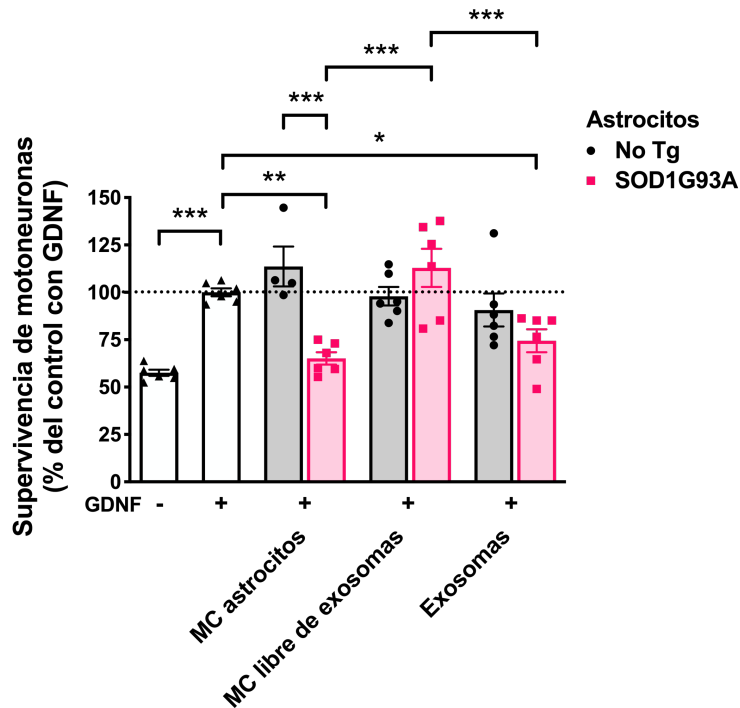


**Figura 16.- Caracterización de los exosomas de astrocitos. A)** Micrografías electrónicas de transmisión (tinción negativa) del contenido de la fracción exosomal aislada del medio de cultivo de astrocitos. Barras de escala: 100 nm. **B)** Distribución de frecuencias representativa del diámetro de las vesículas aisladas (n= 254 vesículas). **C)** Western blot de proteínas de la fracción exosomal de muestras de astrocitos utilizando anticuerpos contra los marcadores CD9, TSG101 y flotillin-1.

*LA FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN EXOSOMAS DE ASTROCITOS SOD1G93A REDUCE LA SUPERVIVENCIA DE MOTONEURONAS NO TG EN CULTIVOS*

Para evaluar los efectos de la fracción exosomal del medio condicionado de astrocitos sobre la supervivencia de motoneuronas, tratamos motoneuronas purificadas en cultivo preincubadas en presencia de GDNF por 24 horas, con medio condicionado de astrocitos no Tg (control) y SOD1G93A en dilución (1:100) con medio de cultivo. Luego de 48 horas de incubación se realizó el conteo neuronal (Figura 17).

Las motoneuronas embrionarias en cultivo requieren del agregado de factor trófico GDNF o BDNF para su supervivencia y en ausencia de este se observa una disminución del 50% en el número de motoneuronas. El medio condicionado de astrocitos SOD1G93A redujo el número de motoneuronas cultivadas en presencia de GDNF, al nivel similar del número de motoneuronas en privación de factor trófico. Esta acción neurotóxica fue eliminada cuando se removieron los exosomas del medio condicionado mediante ultracentrifugación (medio libre de exosomas). Por otro lado, los exosomas purificados de astrocitos SOD1G93A fueron suficientes para inducir la muerte de motoneuronas (Figura 17). Estos efectos no se observaron en el caso de los medios condicionados y exosomas de astrocitos no Tg. Esto constituye la primera evidencia de que la fracción exosomal es responsable de toxicidad directa hacia motoneuronas en este modelo.



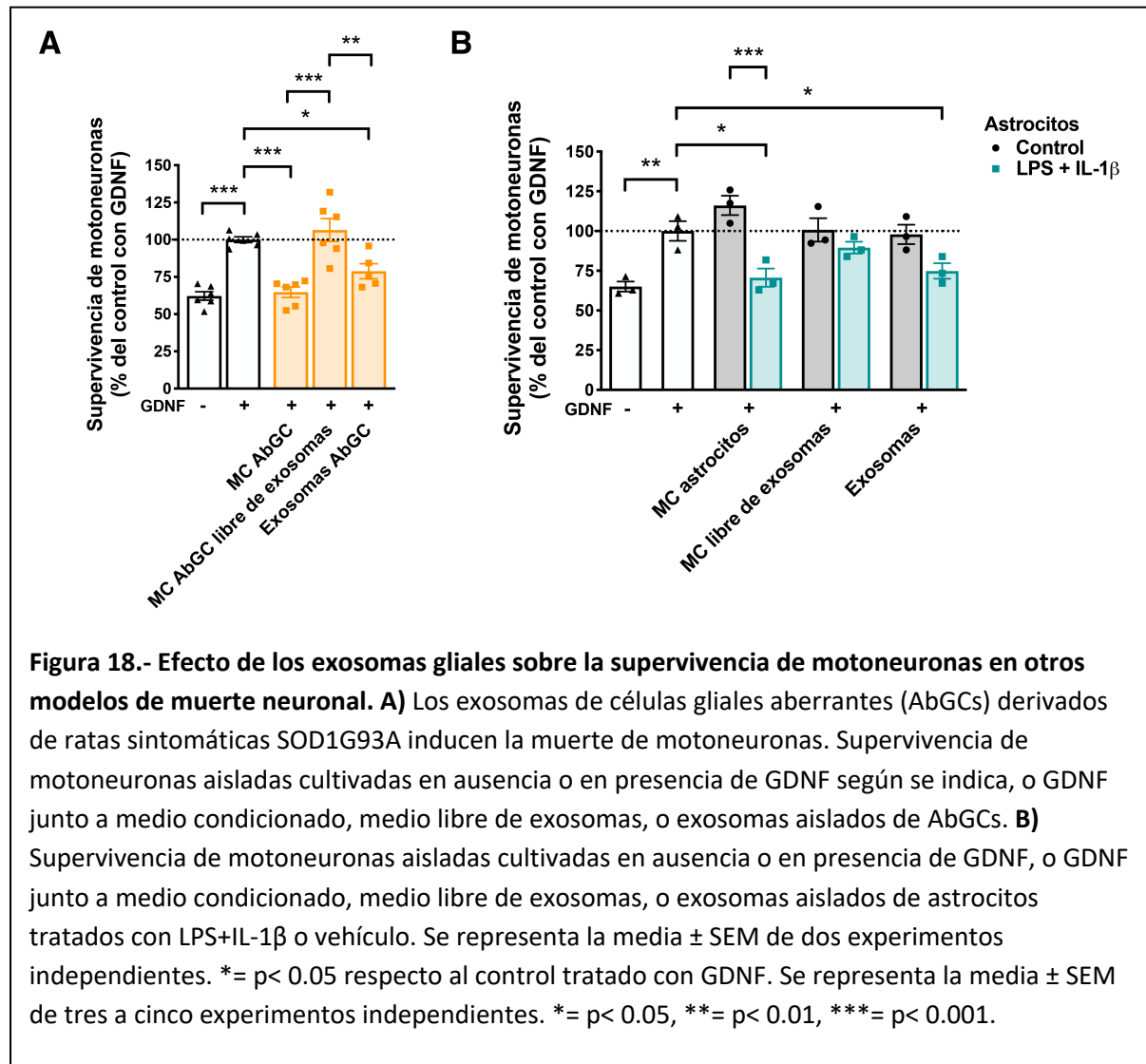
**Figura 17.- Los exosomas de astrocitos neonatales SOD1G93A inducen la muerte de motoneuronas.** Supervivencia de motoneuronas aisladas cultivadas en ausencia de factores tróficos o en presencia de GDNF (Factor neurotrófico derivado de células gliales), o GDNF junto a medio condicionado, medio libre de exosomas, o exosomas aislados de astrocitos no transgénicos o astrocitos SOD1G93A. Se representa la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

Para profundizar el estudio del efecto de los exosomas en la muerte neuronal, extendimos el estudio a otros modelos en los que también se ha demostrado pérdida de actividad neurotrófica de células gliales o inducción de muerte de neuronas. Un efecto similar al observado para los exosomas de astrocitos SOD1G93A neonatales fue mostrado por los exosomas aislados de células gliales aberrantes derivadas de ratas adultas SOD1G93A, con mayor potencial neurotóxico (AbGCs; (Díaz-Amarilla et al., 2011; Martínez-Palma et al., 2019)). La fracción exosomal de las AbGCs redujo de manera significativa el porcentaje de supervivencia de motoneuronas en presencia de factores tróficos de forma similar a lo obtenido para astrocitos SOD1G93A. Sin embargo, este efecto se pierde cuando el medio condicionado está libre de exosomas (Figura 18).

Para estudiar si el efecto de los exosomas de astrocitos sobre las motoneuronas es dependiente de la sobreexpresión de la proteína SOD1G93A, utilizamos otro modelo de reactividad astrocitaria, astrocitos no Tg tratados con LPS+ IL-1 $\beta$ , un estímulo pro-inflamatorio en el que también se ha descrito que el medio condicionado puede inducir la muerte de neuronas (Pehar et al., 2004). Nuevamente, en este modelo se repite el resultado de que la actividad inductora de la muerte neuronal se mantiene



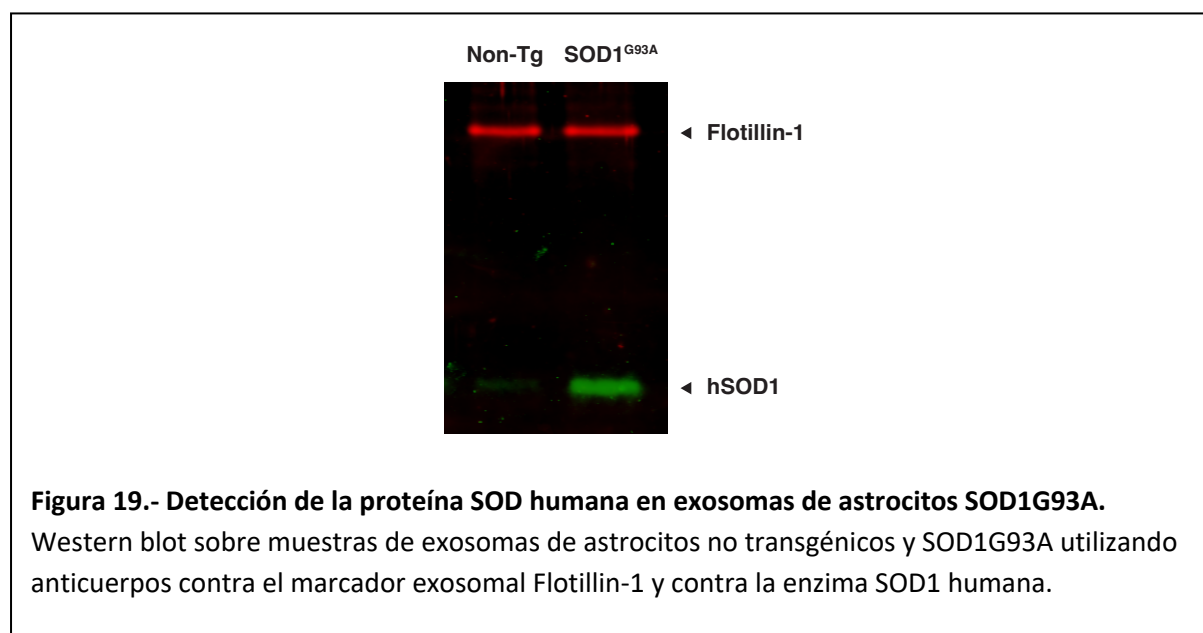
en la fracción exosomal, mientras que el medio condicionado libre de exosomas no presenta actividad neurotóxica (Figura 18). Es decir, el efecto observado podría implicar mecanismos independientes de la presencia de SOD1G93A y aplicables así a otros modelos. La actividad neurotóxica estaría restringida a la fracción exosomal del medio condicionado de los astrocitos.



*LA FRACCIÓN EXOSOMAL DE ASTROCITOS SOD1G93A CONTIENE LA ENZIMA HUMANA SOD1G93A, PERO NO SE DETECTAN OTRAS PROTEÍNAS VINCULADAS CON MUERTE DE MOTONEURONAS*

Para identificar proteínas presentes en los exosomas de astrocitos SOD1G93A que puedan participar de la actividad neurotóxica, se buscaron algunas de las que han sido reportadas como inductores de muerte de motoneuronas.

En primer lugar buscamos la presencia de SOD humana (Figura 19), dado que ha sido reportado que la incubación de motoneuronas no Tg con exosomas de astrocitos SOD1G93A determina la presencia de la enzima en las motoneuronas detectada por microscopía electrónica de transmisión (Basso et al., 2013). Detectamos la presencia de SOD humana en muestras de exosomas de astrocitos SOD1G93A, pero no en los no Tg, confirmando que la proteína puede ser empaquetada los exosomas de las células que la expresan.



A continuación, hicimos una búsqueda bibliográfica de potenciales proteínas que se han reportado como implicadas en mecanismos de muerte neuronal o procesos neuroinflamatorios y han sido detectadas en exosomas en distintos modelos, para detectar si se encontraban presentes en los exosomas de los astrocitos SOD1G93A (Tabla 1).

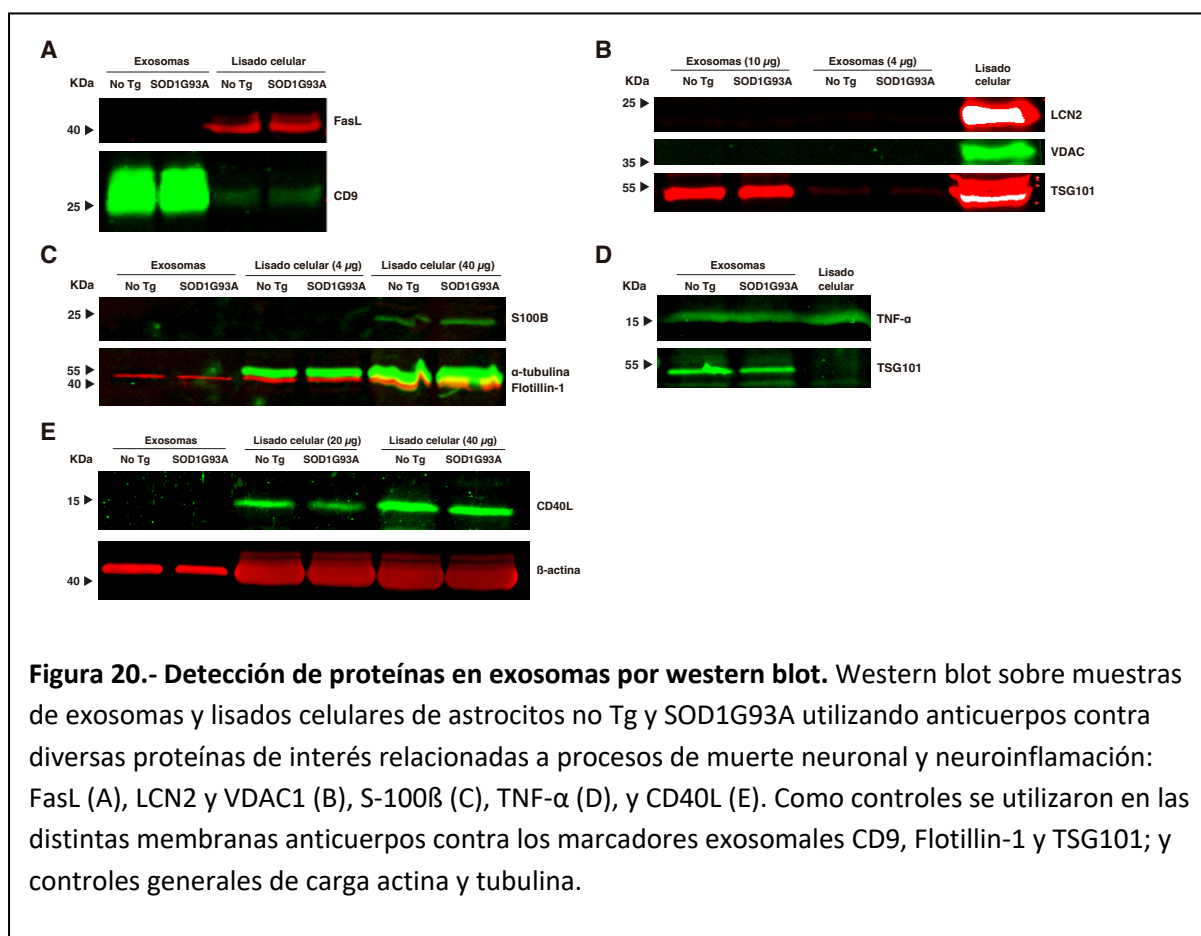
Realizamos ensayos de western blot contra FAS-L, una de las vías propuesta como inductora de la neurotoxicidad (Alonso et al., 2005; Raoul et al., 2002; L. Zhu et al., 2017); la proteína S100B, la cual

es expresada por astrocitos y para la que se han descrito roles neurotróficos y neurotóxicos, además de encontrarse sobre-expresada en la médula espinal de pacientes con ELA (Baudier & Gentil, 2020; Migheli et al., 1999; Serrano et al., 2017); TNF- $\alpha$ , citoquina inflamatoria y responsable de procesos de señalización de muerte (Gao et al., 2016; Jensen et al., 2022; L. Zhu et al., 2017); nitro-NGF, variante nitrada del NGF, que se ha propuesto que presenta un rol clave en la muerte neuronal en la ELA (Aiello et al., 2020; H. H. Jung et al., 2021; Kim et al., 2018; Pehar et al., 2006); Lipocalina 2 (LCN2), proteína involucrada en procesos neuroinflamatorios, capaz de activar la reactividad astrocitaria y de inducir muerte de neuronas (Bi et al., 2013; Borkham-Kamphorst et al., 2018; Lee et al., 2009, 2012); y CD40L, expresada en astrocitos asociada a procesos neuroinflamatorios (Federici et al., 2020; Lincecum et al., 2010; Ots et al., 2022). Por otro lado, también buscamos la presencia de la proteína mitocondrial VDAC1, siguiendo la idea de que la disfunción mitocondrial podría inducir el aumento de proteínas mitocondriales en los exosomas, adquiriendo actividad pro-inflamatoria (Crewe et al., 2021).

A pesar de identificar las proteínas mencionadas en los lisados celulares, con esta técnica no detectamos la presencia de FasL, S100B, LCN2, VDAC1 ni CD40L en los exosomas de ambos tipos de astrocitos (Figura 20). Sin embargo, si detectamos la presencia de TNF- $\alpha$  en la fracción exosomal, aunque con el mismo nivel de expresión en exosomas no Tg y SOD1G93A. Los resultados obtenidos para la detección de nitro-NGF son no conclusivos y ameritan mayor exploración.

**Tabla 1.- Proteínas cuya presencia intentamos evidenciar en los exosomas de astrocitos SOD1G93A**

Proteína	Funciones / procesos	Referencias
<b>FasL</b>	Vías de muerte celular	(Alonso et al., 2005; Raoul et al., 2002; L. Zhu et al., 2017)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Citoquina proinflamatoria	(Gao et al., 2016; Jensen et al., 2022; L. Zhu et al., 2017)
<b>LCN2</b>	Neuroinflamación, gliosis, muerte neuronal	(Bi et al., 2013; Borkham-Kamphorst et al., 2018; Lee et al., 2009, 2012)
<b>CD40L</b>	Neuroinflamación, regulación de activación de células inmunes	(Federici et al., 2020; Lincecum et al., 2010; Ots et al., 2022)
<b>S100B</b>	Unión a calcio. Astrocitos. Neurotrófico/Neurotóxico	(Baudier & Gentil, 2020; Migheli et al., 1999; Serrano et al., 2017)
<b>VDAC1</b>	En membrana externa mitocondrial. Apoptosis	(Crewe et al., 2021; Dubey et al., 2016; Shoshan-Barmatz et al., 2010)
<b>nitro-NGF</b>	Asociado a muerte neuronal en modelos de ELA	(Aiello et al., 2020; H. H. Jung et al., 2021; Kim et al., 2018; Pehar et al., 2006)



### EL ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS EXOSOMAS MUESTRA VARIACIONES EN EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS RELEVANTE PARA LA FUNCIÓN NEURAL

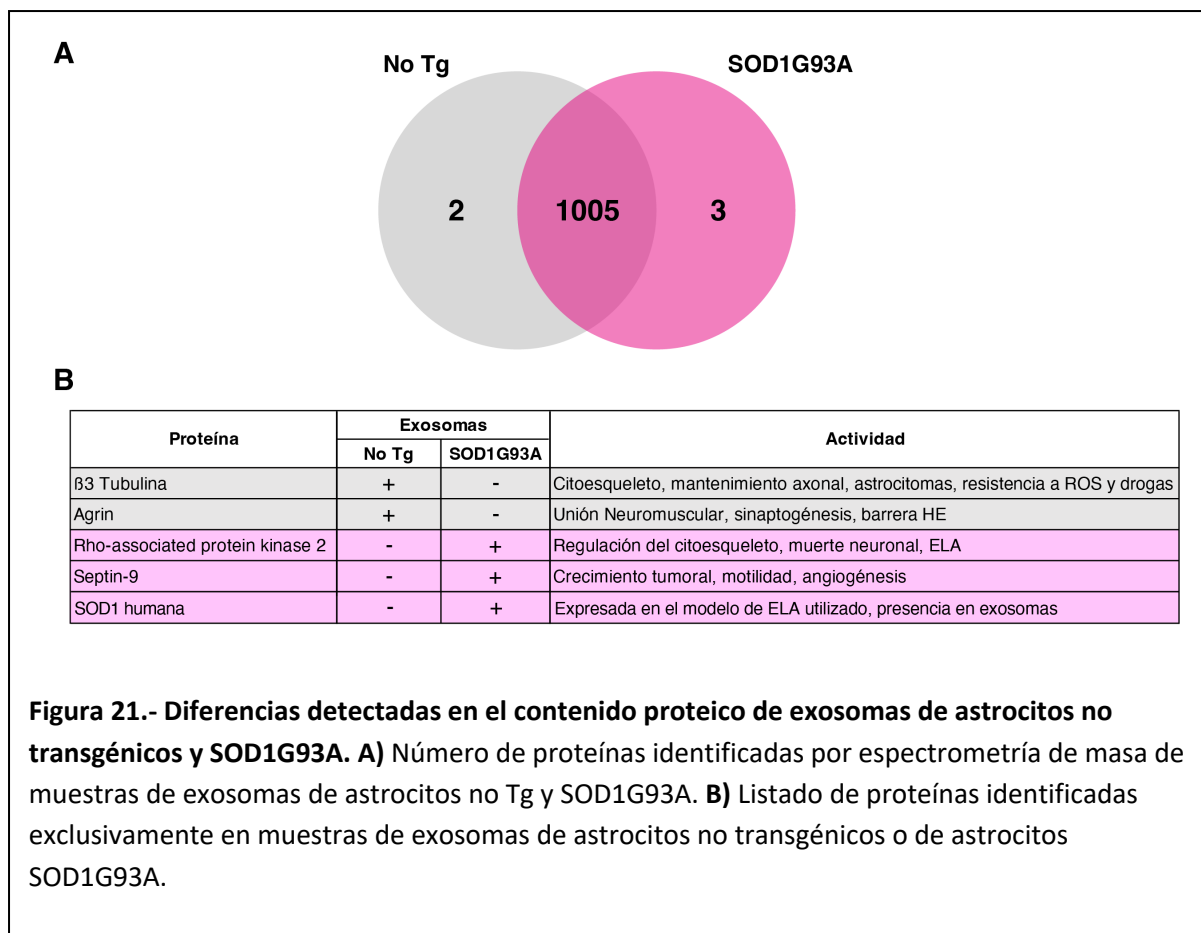
Con el objetivo de profundizar en el análisis del contenido de exosomas, establecimos una colaboración con la Dra. Mariana Pehar de la Universidad Médica de Carolina del Sur, EEUU, a los efectos de realizar un análisis proteómico detallado de los exosomas de astrocitos. Se analizaron muestras de fracciones enriquecidas en exosomas no Tg y SOD1G93A (Figura 21).

En las muestras pudimos detectar las proteínas marcadoras de exosomas TSG101, CD9 y Hsp70, y sus niveles no varían entre los exosomas no Tg y SOD1G93A. El 75% de las proteínas más frecuentemente encontradas en exosomas según ExoCarta (Keerthikumar et al., 2016) estaba presente en estas muestras. Del análisis proteómico también surgió que varias proteínas que se expresan normalmente en astrocitos estaban presentes en los exosomas, y no presentaron variación entre exosomas no Tg y SOD1G93A: S100B, GFAP, Vimentina, fibronectina.

Se identificaron algunas proteínas que están presentes solo en los exosomas no Tg o en los SOD1G93A y que podrían resultar blancos potenciales para contribuir a explicar los mecanismos patogénicos de la enfermedad (Figura 21). Entre ellas, detectamos la presencia de SOD1 humana en los exosomas SOD1G93A, confirmando nuestros resultados de western blot y otros reportes.

Dos proteínas presentes únicamente en las muestras de exosomas no Tg son  $\beta$ 3-tubulina y Agrin. La primera es un componente del citoesqueleto y está vinculada con el mantenimiento axonal. Agrin es un proteoglicano que participa del desarrollo y mantenimiento de las uniones neuromusculares, y en el SNC ha sido relacionado con la organización y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Noël et al., 2020; Noell et al., 2009).

Además de la enzima SOD1 humana, dos proteínas presentes en forma exclusiva en exosomas de astrocitos SOD1G93A son Septin-9 y Rho-associated protein kinase 2 (ROCK2). Septin-9 es una GTPasa pequeña que ha sido relacionada a procesos de proliferación y motilidad celular, vinculada a crecimiento tumoral. ROCK2 es una quinasa vinculada a procesos varios como regulación del citoesqueleto y procesos de muerte celular. El hecho de que ya ha sido vinculada previamente a la ELA (Conti et al., 2014; Iridoy et al., 2018; Tönges et al., 2014), nos hizo enfocarnos en esta proteína particular para seguir estudiando su presencia en los exosomas. Intentamos confirmar los datos de proteómica por western blot, pero por el momento no logramos detectar la presencia de Rock2 con esta técnica (Figura suplementaria 1).



Para continuar con el análisis del contenido de los exosomas, la Dra. Soledad Marton integrante de nuestro laboratorio se focalizó en el estudio de la carga en microRNAs y hemos generado un manuscrito conjunto que será enviado a la brevedad a International Journal of Molecular Sciences:

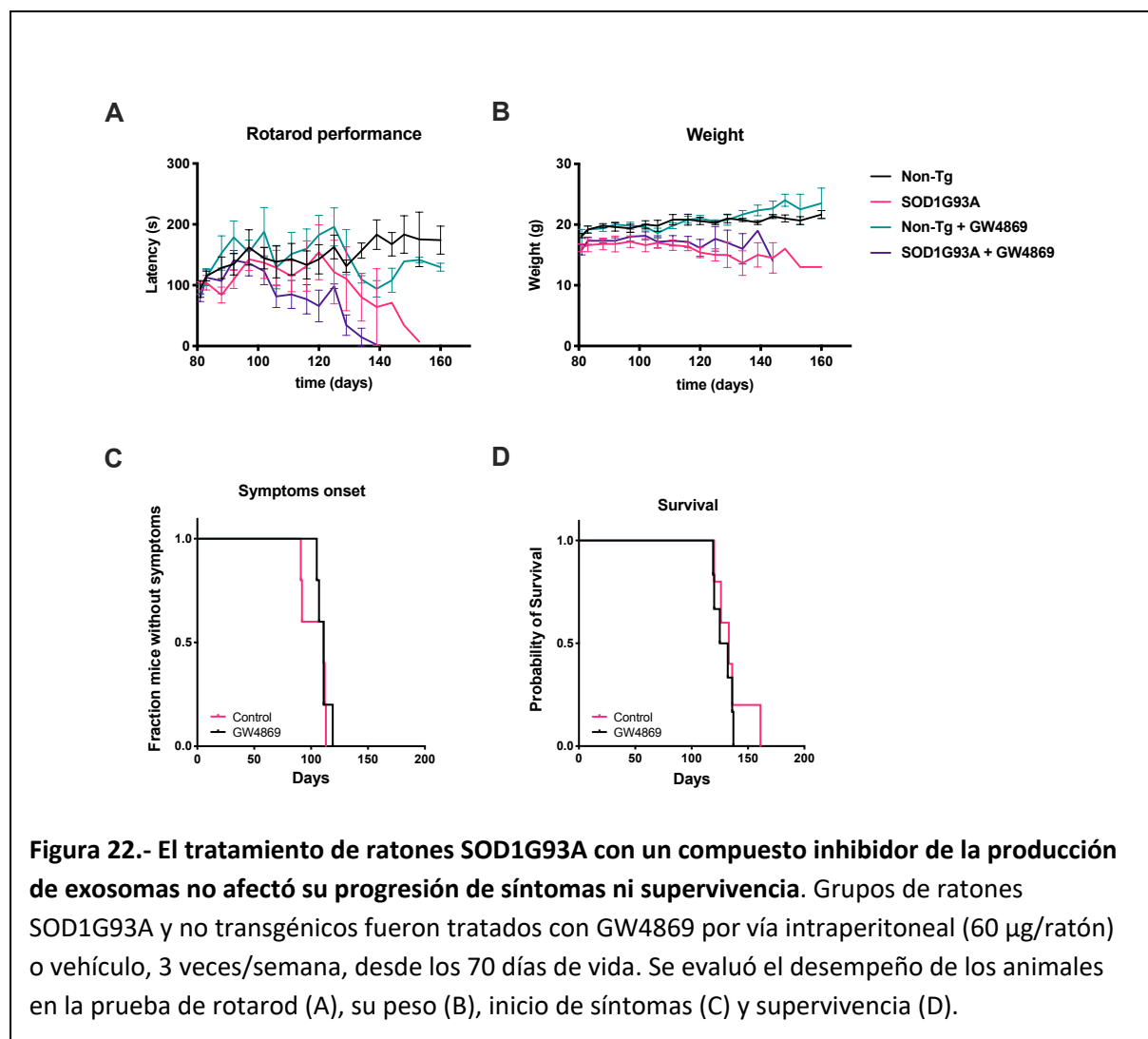
Marton, S., Miquel, E., Acosta, J., Cassina, P. SOD1G93A astrocyte-derived extracellular vesicles induce motor neuron death by a miRNA155-5p mediated mechanism. International Journal of Molecular Sciences (en preparación).

*ESTUDIO DEL EFECTO DE UN INHIBIDOR DE LA PRODUCCIÓN DE EXOSOMAS SOBRE EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD EN UN MODELO ANIMAL DE ELA*

Con el objetivo de analizar la participación de la vía de señalización por exosomas en la progresión de síntomas asociados a la ELA, nos propusimos estudiar el efecto de un compuesto inhibidor de la producción de exosomas *in vivo* en el modelo murino de la enfermedad. Utilizamos el compuesto GW4869, reconocido inhibidor de la nSMase2, lo cual tiene como consecuencia la inhibición de la

producción de exosomas y ya ha sido extensivamente utilizado con este fin en diversos modelos (Essandoh et al., 2015; Trajkovic et al., 2008).

Grupos de ratones SOD1G93A y no Tg fueron tratados con GW4869 por vía intraperitoneal (60 µg/ratón) o vehículo, 3 veces/semana tal como se ha reportado previamente (Essandoh et al., 2015). El tratamiento comenzó a los 70 días de vida (etapa pre-sintomática) y continuó hasta la muerte. Evaluamos peso de los animales, desempeño en pruebas motoras y supervivencia (Figura 22). No encontramos diferencias entre el inicio, progresión de síntomas ni supervivencia entre los grupos de animales. Previamente se habían realizado ensayos preliminares comenzando el tratamiento a los 90 días de vida, sin constatarse efectos sobre la supervivencia (Figura suplementaria 2).



**Figura 22.- El tratamiento de ratones SOD1G93A con un compuesto inhibidor de la producción de exosomas no afectó su progresión de síntomas ni supervivencia.** Grupos de ratones SOD1G93A y no transgénicos fueron tratados con GW4869 por vía intraperitoneal (60 µg/ratón) o vehículo, 3 veces/semana, desde los 70 días de vida. Se evaluó el desempeño de los animales en la prueba de rotarod (A), su peso (B), inicio de síntomas (C) y supervivencia (D).

## DISCUSIÓN

La incapacidad de los astrocitos en modelos de ELA para mantener una actividad trófica hacia motoneuronas, o incluso inducir la muerte de éstas, ha sido descrita y estudiada por más de 15 años (Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007; Vargas et al., 2006). En el trabajo presentado en este capítulo se demostró que la disminución de la supervivencia de motoneuronas en cultivo en presencia de medio condicionado de astrocitos SOD1G93A se encuentra, al menos en parte, restringida a la fracción exosomal del medio. La fracción exosomal fue capaz de inducir la muerte de motoneuronas, mientras que el medio condicionado libre de exosomas perdió su neurotoxicidad. La relevancia de estos resultados radica en lo elusivo que ha sido el putativo “factor neurotóxico” de la glía en la ELA. El aportar datos que apoyan el rol de las vesículas extracelulares en el proceso tiene la posibilidad de facilitar el desarrollo de posibles terapias más efectivas. Otros trabajos recientes revelaron que las vesículas extracelulares de astrocitos SOD1G93A reducen la viabilidad de motoneuronas (Basso et al., 2013), pero en presencia de astrocitos en cocultivo. En nuestro caso demostramos que la incubación con la fracción exosomal determina una disminución de la supervivencia de motoneuronas aisladas. En apoyo a estos resultados también se ha mostrado que el medio condicionado o vesículas extracelulares de astrocitos diferenciados a partir de fibroblastos de pacientes de ELA con la mutación C9orf72 inducen una reducción de la supervivencia de motoneuronas (Varcianna et al., 2019).

Se optimizó el método de obtención de la fracción exosomal de astrocitos y se caracterizó la misma, detectándose vesículas redondeadas del tamaño esperado (60-120 nm de diámetro), positivas para flotillin-1, CD9 y TSG101, como ha sido reportado en la literatura (Théry et al., 2009). Se detectó la presencia de SOD1 humana en los exosomas de los astrocitos SOD1G93A, lo cual coincide con trabajos previos que demostraron su presencia en vesículas extracelulares (Basso et al., 2013; Silverman et al., 2019). Los resultados de Basso et al. mostraron que la proteína SOD1G93A presente en los exosomas puede ser incorporada a las neuronas por esta vía. La proteína SOD1G93A también se encuentra presente en el medio condicionado de astrocitos libre de exosomas, aunque por esta vía no se detecta su incorporación al interior de las neuronas (Basso et al., 2013).

Algunos autores plantean que la presencia de SOD1 mutada en los exosomas de astrocitos podría tener en sí misma un efecto nocivo hacia motoneuronas, desencadenando procesos de agregación de proteínas, propagación de estados mal plegados en forma similar a los priones, acumulación en mitocondria, etc. (Basso et al., 2013; Hanspal et al., 2017; Silverman et al., 2016). Sin embargo, nuestro hallazgo de que también los exosomas derivados de astrocitos no Tg estimulados con LPS también



inducen muerte de motoneuronas, sugiere que otros mecanismos además de la incorporación de la enzima mutada podría estar involucrado.

Iniciamos estudios en el contenido proteico de los exosomas de astrocitos SOD1G93A y encontramos algunas variaciones entre exosomas no Tg y SOD1G93A que potencialmente podrían correlacionarse con su actividad neurotóxica. Estos estudios preliminares requieren de mayor desarrollo y validación para determinar la participación de alguno de estos componentes en la toxicidad mediada por astrocitos. Es llamativa la presencia de  $\beta$ -III tubulina en muestras de exosomas de astrocitos no Tg, ya que es un marcador neuronal. Podría tratarse de contaminación, aunque su presencia se repitió en muestras de experimentos diferentes. De todas formas, en ciertas situaciones células de la línea glial la pueden expresar, ya que se ha reportado su presencia en astrocitos fetales (Dráberová et al., 2008) y astrocitomas (Katsetos et al., 2001), e incluso se ha reportado su expresión en células de cáncer pulmonar, donde les aporta resistencia a drogas quimioterapéuticas. De todas formas, es interesante destacar las proteínas que se encontraron exclusivamente en exosomas de astrocitos SOD1G93A: ROCK2 y Septina-9. Las proteína quinasas asociadas a Rho (Rho quinasas, ROCK) son un grupo de Serina/treonina quinasas originalmente identificadas como efectores de la GTPasa RhoA. Están involucradas en la modulación del citoesqueleto, regulando movimientos celulares y estabilidad de prolongaciones, apoptosis, supervivencia, neuroinflamación y proliferación celular (Julian & Olson, 2014). En el sistema nervioso, limita el crecimiento axonal y previene la recuperación neuronal luego de una injuria. La inhibición de ROCK2 tiene efectos beneficiosos en modelos de neurodegeneración (Enfermedad de Parkinson y Alzheimer) (Sharma & Roy, 2020). ROCK2 también ha sido vinculada previamente a la ELA (Conti et al., 2014; Iridoy et al., 2018; Tönges et al., 2014). Las septinas son un nuevo grupo de GTPasas, identificadas en levaduras y luego encontradas en múltiples tipos celulares de otras especies (Macara et al., 2002). Septin-9, es un miembro más reciente de la familia, se expresa ubicuamente y está involucrada en un creciente número de vías de señalización. Se ha detectado su sobreexpresión en enfermedades neurodegenerativas y en trauma encefálico (Mao et al., 2013). Además, es una proteína involucrada en el crecimiento tumoral. Es importante resaltar que su expresión ha sido reportada en gliomas y la inhibición de la misma ha sido capaz de inhibir la proliferación y detuvo la capacidad invasora de las células de glioma (D. Xu et al., 2018).

Adicionalmente, variaciones en las cadenas polipeptídicas no son necesariamente la única fuente de diferencias posibles en la carga de los exosomas. Modificaciones postraduccionales de las proteínas pueden alterar dramáticamente su actividad y quizás jugar un rol en la muerte neuronal. De particular interés en el ambiente nitrooxidativo de la ELA es la nitración proteica y los cambios de actividad que puede inducir en las proteínas blanco (Cassina et al., 2002; Franco et al., 2015; Pehar et al., 2006; Radi,

Cassina, & Hodara, 2002). Algunas de las proteínas que han sido encontradas en exosomas y buscamos en este trabajo cuentan con vías clásicas de secreción, lo cual hace de su presencia en exosomas algo llamativo, aunque continuamente se reportan nuevos ejemplos. Su empaquetamiento en vesículas extracelulares les podría brindar protección y capacidad de llegar a destinos más lejanos no accesibles por proteínas solubles, o atravesar barreras biológicas, y mantienen su actividad biológica (Aiello et al., 2020). El balance entre la utilización de la vía secretoria clásica o vías alternativas es afectado por señales extracelulares, por ejemplo en un ambiente inflamatorio.

En el campo de las vesículas extracelulares es de particular importancia el papel de los exosomas en el tráfico de pequeños ARN, los cuales pueden alterar la expresión génica en las células blanco (Valadi et al., 2007). Esta línea de trabajo también está siendo explorada en nuestro laboratorio.

A pesar de los beneficiosos efectos de eliminar los exosomas SOD1G93A sobre la supervivencia neuronal en cultivo, la inhibición de la formación de exosomas *in vivo* utilizando el compuesto GW4869 no mejoró el desempeño ni supervivencia de los ratones SOD1G93A. Estos resultados concuerdan con hallazgos conseguidos por otro grupo de investigación en otro modelo de ELA en el mismo momento que realizábamos este trabajo: En el modelo de ratones mutantes TDP-43A315T, el tratamiento con GW4869, a pesar de presentar resultados promisorios *in vitro*, no mejoró la supervivencia de los ratones TDP-43A315T, e incluso aceleró el desarrollo de síntomas (Iguchi et al., 2016). Incluso si la vía exosomal fuera clave para la progresión de la muerte neuronal en el animal, es esperable que una alteración tan grande como lo es inhibir la producción de exosomas en todos los tipos celulares del organismo termine teniendo efectos nocivos generales que enmascaren cualquier efecto beneficioso. De hecho, se especula que la vía de los cuerpos multivesiculares y exosomas es necesaria para que las neuronas eliminen agregados proteicos frecuentemente formados en los distintos tipos de ELA y modelos animales (Iguchi et al., 2016). Una eficiente degradación por la vía de autofagia también requiere la correcta formación de cuerpos multivesiculares (Fader & Colombo, 2009). De hecho, la inhibición de la expresión de Tsg101 llevó a la acumulación de autofagosomas y formación de inclusiones citoplasmáticas de TDP-43 (Filimonenko et al., 2007). Además, el inhibidor de nSMase2 GW4869 probablemente inhibe no solo la formación de exosomas sino también la de cuerpos multivesiculares, ya que la ceramida es un componente de ambos. Resultaría interesante la exploración de algún mecanismo que permita la inhibición de la liberación de exosomas únicamente en los astrocitos, para evitar alterar otros procesos fisiológicos.

## CONCLUSIONES

Los astrocitos en el modelo de ELA SOD1G93A son capaces de inducir la muerte neuronal en cultivo, y este fenómeno, al menos en parte, parece estar mediado por la vía de señalización basada en vesículas extracelulares, particularmente los exosomas. Identificamos pequeñas diferencias en la carga proteica de los exosomas de astrocitos no Tg y SOD1G93A, que ameritan mayor exploración. Es interesante destacar que otros modelos de astrocitos reactivos que inducen muerte neuronal, como los estimulados por LPS o FGF que no expresan la SOD1G93A, también inducen muerte selectivamente en la fracción exosomal, y por lo tanto existe algún otro mecanismo además de la presencia de la SOD1G93A. La inhibición de la producción de exosomas en el modelo de ELA de ratones SOD1G93A no altera la progresión de síntomas ni su supervivencia.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Durante el trabajo de esta tesis aportamos información acerca de la patología de la ELA y que enumeramos a continuación:

La función mitocondrial en astrocitos está vinculada a la capacidad de los astrocitos de sostener la supervivencia neuronal. Este ha sido el hilo conductor de nuestro trabajo desde hace muchos años y representa el eje sobre el que desarrollamos este trabajo de tesis. Los resultados recabados en este documento y sus publicaciones asociadas refuerzan este concepto, aportan datos novedosos y abren la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la ELA.

En el capítulo 1 demostramos que la neutralización de ERONS a nivel mitocondrial modifica el curso de la enfermedad. Aumenta la bioenergética mitocondrial y reduce la reactividad glial en la médula espinal. Los animales tratados mantuvieron la fuerza de agarra por mas tiempo y aumentaron su tiempo de vida. La preparación oral de MitoQ ha sido validada para su utilización en humanos por lo que puede significar una terapia alternativa para ELA que amerita exploración en ensayos clínicos (Gane et al., 2010; Rossman et al., 2018; Shill et al., 2016; Snow et al., 2010).

En el capítulo 2 ofrecemos evidencia relevante para una estrategia específica de tipo celular para revertir la toxicidad mediada por astrocitos. Nuestra perspectiva a futuro es desarrollar vectores virales que nos permitan el silenciamiento de PDK2 *in vivo* bajo un promotor como el de GLAST, que limite su expresión a astrocitos, evitando los efectos de la inhibición de PDK sobre otros tipos celulares. La perspectiva de utilizar este tipo de vector en animales SOD1G93A resultaría en un estudio preclínico para validar esta estrategia como terapia alternativa para ELA. Los resultados muy auspiciosos que muestran los estudios de terapia génica en ELA con Tofersen, un siRNA para SOD1 (Miller et al., 2020), muestran que este tipo de estudios podría modificar el curso de la enfermedad. Un aspecto en el que seguiremos trabajando es en disecar los mecanismos que vinculan la actividad mitocondrial y el fenotipo neurotóxico de los astrocitos.

En el capítulo 3 demostramos que la fracción exosomal de astrocitos SOD1G93A induce muerte neuronal y que además de contener la enzima SOD1 humana contienen exclusivamente otras proteínas no presentes en exosomas de astrocitos no Tg. Un paso a seguir en este trabajo es optimizar los métodos de obtención de exosomas para contar con mayor concentración de proteínas en cada muestra. Esto permitiría un análisis más robusto de las diferencias en la carga proteica de exosomas no Tg y SOD1G93A y además de confirmar las proteínas presentes en forma exclusiva en una u otra

muestra, encontrar diferencias significativas en los niveles de expresión de las proteínas que se encuentran en ambos tipos de muestra. Luego de confirmar las proteínas de interés, procederíamos a continuar estudios en cultivos celulares inhibiendo su expresión génica, tanto para evaluar su efecto sobre motoneuronas como su capacidad de propagar cambios fenotípicos entre astrocitos. Estos resultados significan un aporte hacia la dilucidación del o de los factores responsables de mediar la muerte neuronal inducida por la glía en la ELA. Por otro lado, resultaría interesante extender los análisis proteómicos del contenido exosomal a otros modelos, como los astrocitos no Tg tratados con un estímulo proinflamatorio, o astrocitos sometidos a inhibición de los complejos respiratorios mitocondriales, para encontrar mediadores de neurotoxicidad astrocitaria que no se restrinjan al modelo de ELA. Por último, un proyecto en el que pensamos trabajar es en el estudio de los componentes lipídicos de los exosomas de astrocitos y cómo varía en los modelos de ELA. Los procesos de señalización intercelular mediados por exosomas podrían no estar basados en su carga proteica sino en cambios en la proporción de especies lipídicas de membrana.

## REFERENCIAS

- Abemayor, E., Kovachich, G. B., & Hugaard, N. (1984). Effects of Dichloroacetate on Brain Pyruvate Dehydrogenase. *Journal of Neurochemistry*, 42(1), 38–42. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb09694.x>
- Adebayo, M., Singh, S., Singh, A. P., & Dasgupta, S. (2021). Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis. *The FASEB Journal*, 35(6), 1–23. <https://doi.org/10.1096/fj.202100067R>
- Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J., & Tang, X. (2017). Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(2), 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
- Aiello, A., Giannesi, F., Percario, Z. A., & Affabris, E. (2020). An emerging interplay between extracellular vesicles and cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 51(November), 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.12.003>
- Al-Chalabi, A., Fang, F., Hanby, M. F., Leigh, P. N., Shaw, C. E., Ye, W., & Rijsdijk, F. (2010). An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 81(12), 1324–1326. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.207464>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2017). *Molecular Biology of the Cell* (J. Wilson & T. Hunt (eds.)). W.W. Norton & Company. <https://doi.org/10.1201/9781315735368>
- Alessenko, A. V., Shupik, M. A., Gutner, U. A., Bugrova, A. E., Dudnik, L. B., Shingarova, L. N., Mikoyan, A., & Vanin, A. F. (2005). The relation between sphingomyelinase activity, lipid peroxide oxidation and NO-releasing in mice liver and brain. *FEBS Letters*, 579(25), 5571–5576. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.085>
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Glia — more than just brain glue. *Nature*, 457(7230), 675–677. <https://doi.org/10.1038/457675a>
- Allen, N. J., & Lyons, D. A. (2018). Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*, 362(6411), 181–185. <https://doi.org/10.1126/science.aat0473>
- Alonso, R., Rodríguez, M. C., Pindado, J., Merino, E., Mérida, I., & Izquierdo, M. (2005). Diacylglycerol Kinase  $\alpha$  Regulates the Secretion of Lethal Exosomes Bearing Fas Ligand during Activation-induced Cell Death of T Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(31), 28439–28450. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501112200>
- Amado, D. A., & Davidson, B. L. (2021). Gene therapy for ALS: A review. *Molecular Therapy*, 29(12), 3345–3358. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.008>
- Ari, C., Poff, A. M., Held, H. E., Landon, C. S., Goldhagen, C. R., Mavromates, N., & D’Agostino, D. P. (2014). Metabolic Therapy with Deanna Protocol Supplementation Delays Disease Progression and Extends Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Mouse Model. *PLoS ONE*, 9(7), e103526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103526>
- Atsumi, T. (1981). The ultrastructure of intramuscular nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 55(3), 193–198. <https://doi.org/10.1007/BF00691318>

- Bailey, A. P., Koster, G., Guillermier, C., Hirst, E. M. A., MacRae, J. I., Lechene, C. P., Postle, A. D., & Gould, A. P. (2015). Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell*, *163*(2), 340–353. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.020>
- Baker, P. R. S., Lin, Y., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Groeger, A. L., Batthyany, C., Sweeney, S., Long, M. H., Iles, K. E., Baker, L. M. S., Branchaud, B. P., Chen, Y. E., & Freeman, B. A. (2005). Fatty Acid Transduction of Nitric Oxide Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(51), 42464–42475. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504212200>
- Barbeito, L. H., Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Peluffo, H., Viera, L., Estévez, A. G., & 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>
- Basso, M., Pozzi, S., Tortarolo, M., Fiordaliso, F., Bisighini, C., Pasetto, L., Spaltro, G., Lidonnici, D., Gensano, F., Battaglia, E., Bendotti, C., & Bonetto, V. (2013). Mutant Copper-Zinc Superoxide Dismutase (SOD1) Induces Protein Secretion Pathway Alterations and Exosome Release in Astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(22), 15699–15711. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.425066>
- Baudier, J., & Gentil, B. J. (2020). The s100b protein and partners in adipocyte response to cold stress and adaptive thermogenesis: Facts, hypotheses, and perspectives. *Biomolecules*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/biom10060843>
- Beghi, E., Pupillo, E., Bonito, V., Buzzi, P., Caponnetto, C., Chiò, A., Corbo, M., Giannini, F., Inghilleri, M., Bella, V. La, Logroscino, G., Lorusso, L., Lunetta, C., Mazzini, L., Messina, P., Mora, G., Perini, M., Quadrelli, M. L., Silani, V., ... Tremolizzo, L. (2013). Randomized double-blind placebo-controlled trial of acetyl-L-carnitine for ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, *14*(5–6), 397–405. <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.764568>
- Bellissimo, C. A., Garibotti, M. C., & Perry, C. G. R. (2022). Mitochondrial Stress Responses in Duchenne muscular dystrophy: Metabolic Dysfunction or Adaptive Reprogramming? *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *7*(1), 37–72. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00249.2022>
- Bi, F., Huang, C., Tong, J., Qiu, G., Huang, B., Wu, Q., Li, F., Xu, Z., Bowser, R., Xia, X.-G., & Zhou, H. (2013). Reactive astrocytes secrete Icn2 to promote neuron death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(10), 4069–4074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218497110>
- Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kassiotis, G., Kollias, G., & Cleveland, D. W. (2006). Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia. *Science*, *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*(S2), 115–125. <https://doi.org/10.1111/jnc.13486>
- Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C. T., Lopaschuk, G. D., Puttagunta, L., Bonnet, S., Harry, G., Hashimoto, K., Porter, C. J., Andrade, M. A., Thebaud, B., & Michelakis, E. D. (2007). A Mitochondria-K<sup>+</sup> 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>
- Bonvento, G., & Bolaños, J. P. (2021). Astrocyte-neuron metabolic cooperation shapes brain activity. *Cell Metabolism*, *33*(8), 1546–1564. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.07.006>
- Bordet, T., Buisson, B., Michaud, M., Drouot, C., Galéa, P., Delaage, P., Akentieva, N. P., Evers, A. S., Covey, D. F., Ostuni, M. A., Lacapère, J.-J., Massaad, C., Schumacher, M., Steidl, E.-M., Maux, D.,

- Delaage, M., Henderson, C. E., & Pruss, R. M. (2007). Identification and Characterization of Cholest-4-en-3-one, Oxime (TRO19622), a Novel Drug Candidate for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *322*(2), 709–720. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.123000>
- Borkham-Kamphorst, E., Van de Leur, E., Meurer, S. K., Buhl, E. M., & Weiskirchen, R. (2018). N-Glycosylation of Lipocalin 2 Is Not Required for Secretion or Exosome Targeting. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(April), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00426>
- Bowker-Kinley, M. M., Davis, W. I., Wu, P., Harris, R. A., & Popov, K. M. (1998). Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical Journal*, *329*(1), 191–196. <https://doi.org/10.1042/bj3290191>
- Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, *435*(2), 297–312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>
- 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>
- Browne, S. E., Yang, L., DiMauro, J.-P., Fuller, S. W., Licata, S. C., & Beal, M. F. (2006). Bioenergetic abnormalities in discrete cerebral motor pathways presage spinal cord pathology in the G93A SOD1 mouse model of ALS. *Neurobiology of Disease*, *22*(3), 599–610. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.01.001>
- Burke, M., Choksawangkarn, W., Edwards, N., Ostrand-Rosenberg, S., & Fenselau, C. (2014). Exosomes from Myeloid-Derived Suppressor Cells Carry Biologically Active Proteins. *Journal of Proteome Research*, *13*(2), 836–843. <https://doi.org/10.1021/pr400879c>
- Cadenas, E., & Davies, K. J. A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, *29*(3–4), 222–230. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8)
- Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de Leon, A., Robinson, K. M., Mason, R. P., Beckman, J. S., Barbeito, L., & Radi, R. (2008). Mitochondrial Dysfunction in SOD1G93A-Bearing Astrocytes Promotes Motor Neuron Degeneration: Prevention by Mitochondrial-Targeted Antioxidants. *Journal of Neuroscience*, *28*(16), 4115–4122. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5308-07.2008>
- Cassina, P., Miquel, E., Martínez-Palma, L., & Cassina, A. (2021). Glial Metabolic Reprogramming in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuroimmunomodulation*, *28*(4), 204–212. <https://doi.org/10.1159/000516926>
- Cassina, P., Pehar, M., Vargas, M. R., Castellanos, R., Barbeito, A. G., Estevez, A. G., Thompson, J. a., Beckman, J. S., & 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., Ressia, A., Beckman, J. S., Estévez, A. G., & 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>
- Chaves-Filho, A. B., Pinto, I. F. D., Dantas, L. S., Xavier, A. M., Inague, A., Faria, R. L., Medeiros, M. H. G., Glezer, I., Yoshinaga, M. Y., & Miyamoto, S. (2019). Alterations in lipid metabolism of spinal cord linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, *9*(1), 11642.



<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48059-7>

- Choi, D.-S., Kim, D.-K., Kim, Y.-K., & Gho, Y. S. (2013). Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *PROTEOMICS*, *13*(10–11), 1554–1571. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200329>
- Clarke, C. J., Snook, C. F., Tani, M., Matmati, N., Marchesini, N., & Hannun, Y. A. (2006). The Extended Family of Neutral Sphingomyelinases. *Biochemistry*, *45*(38), 11247–11256. <https://doi.org/10.1021/bi061307z>
- Clement, A. M., Nguyen, M. D., Roberts, E. A., Garcia, M. L., Boillée, S., Rule, M., McMahon, A. P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R. J., Brown, R. H., Julien, J.-P., Goldstein, L. S. B., & Cleveland, D. W. (2003). Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science*, *302*(5642), 113–117. <https://doi.org/10.1126/science.1086071>
- Conti, A., Riva, N., Pesca, M., Iannaccone, S., Cannistraci, C. V., Corbo, M., Previtali, S. C., Quattrini, A., & Alessio, M. (2014). Increased expression of Myosin binding protein H in the skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1842*(1), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.013>
- Cozzolino, M., Ferri, A., Valle, C., & Carri, M. T. (2013). Mitochondria and ALS: Implications from novel genes and pathways. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *55*, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.06.001>
- Crewe, C., Funcke, J.-B., Li, S., Joffin, N., Gliniak, C. M., Ghaben, A. L., An, Y. A., Sadek, H. A., Gordillo, R., Akgul, Y., Chen, S., Samovski, D., Fischer-Posovszky, P., Kusminski, C. M., Klein, S., & Scherer, P. E. (2021). Extracellular vesicle-based interorgan transport of mitochondria from energetically stressed adipocytes. *Cell Metabolism*, *33*(9), 1853-1868.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.08.002>
- Cudkovicz, M. E., Bozik, M. E., Ingersoll, E. W., Miller, R., Mitsumoto, H., Shefner, J., Moore, D. H., Schoenfeld, D., Mather, J. L., Archibald, D., Sullivan, M., Amburgey, C., Moritz, J., & Gribkoff, V. K. (2011). The effects of dextramipexole (KNS-760704) in individuals with amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Medicine*, *17*(12), 1652–1656. <https://doi.org/10.1038/nm.2579>
- Cudkovicz, M. E., van den Berg, L. H., Shefner, J. M., Mitsumoto, H., Mora, J. S., Ludolph, A., Hardiman, O., Bozik, M. E., Ingersoll, E. W., Archibald, D., Meyers, A. L., Dong, Y., Farwell, W. R., & Kerr, D. A. (2013). Dextramipexole versus placebo for patients with amyotrophic lateral sclerosis (EMPOWER): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Neurology*, *12*(11), 1059–1067. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70221-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70221-7)
- Cutler, R. G., Pedersen, W. a., Camandola, S., Rothstein, J. D., & Mattson, M. P. (2002). Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, *52*(4), 448–457. <https://doi.org/10.1002/ana.10312>
- Danzeisen, R., Schwalenstoecker, B., Gillardon, F., Buerger, E., Krzykalla, V., Klinder, K., Schild, L., Hengerer, B., Ludolph, A. C., Dorner-Ciossek, C., & Kussmaul, L. (2006). Targeted Antioxidative and Neuroprotective Properties of the Dopamine Agonist Pramipexole and Its Nondopaminergic Enantiomer SND919CL2x [(+)-2-Amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-lpropylamino-benzothiazole Dihydrochloride]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *316*(1), 189–199. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.092312>
- Datta Chaudhuri, A., Dasgheyb, R. M., DeVine, L. R., Bi, H., Cole, R. N., & Haughey, N. J. (2020).

- Stimulus-dependent modifications in astrocyte-derived extracellular vesicle cargo regulate neuronal excitability. *Glia*, *68*(1), 128–144. <https://doi.org/10.1002/glia.23708>
- Del Signore, S. J., Amante, D. J., Kim, J., Stack, E. C., Goodrich, S., Cormier, K., Smith, K., Cudkovicz, M. E., & Ferrante, R. J. (2009). Combined riluzole and sodium phenylbutyrate therapy in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, *10*(2), 85–94. <https://doi.org/10.1080/17482960802226148>
- Deng, H.-X., Shi, Y., Furukawa, Y., Zhai, H., Fu, R., Liu, E., Gorrie, G. H., Khan, M. S., Hung, W.-Y., Bigio, E. H., Lukas, T., Dal Canto, M. C., O'Halloran, T. V., & Siddique, T. (2006). Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(18), 7142–7147. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602046103>
- Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(11), 870–879. <https://doi.org/10.1038/nrm2275>
- Dhanasekaran, A., Kotamraju, S., Karunakaran, C., Kalivendi, S. V., Thomas, S., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. (2005). Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: Role of mitochondrial superoxide. *Free Radical Biology and Medicine*, *39*(5), 567–583. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.04.016>
- Di Giorgio, F. P., Carrasco, M. A., Siao, M. C., Maniatis, T., & Eggan, K. (2007). Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nature Neuroscience*, *10*(5), 608–614. <https://doi.org/10.1038/nn1885>
- Díaz-Amarilla, P., Miquel, E., Trostchansky, A., Trias, E., Ferreira, A. M., Freeman, B. A., Cassina, P., Barbeito, L., Vargas, M. R., & 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 and Medicine*, *95*, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.013>
- Díaz-Amarilla, P., Olivera-Bravo, S., Trias, E., Cragolini, A., Martínez-Palma, L., Cassina, P., Beckman, J., & 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>
- Dinkova-Kostova, A. T., & Abramov, A. Y. (2015). The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radical Biology and Medicine*, *88*(Part B), 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036>
- Dodson, M., de la Vega, M. R., Cholanians, A. B., Schmidlin, C. J., Chapman, E., & Zhang, D. D. (2019). Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *59*(1), 555–575. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021856>
- Dráberová, E., Del Valle, L., Gordon, J., Marková, V., Šmejkalová, B., Bertrand, L., de Chadarevian, J.-P., Agamanolis, D. P., Legido, A., Khalili, K., Dráber, P., & Katsetos, C. D. (2008). Class III  $\beta$ -Tubulin Is Constitutively Coexpressed With Glial Fibrillary Acidic Protein and Nestin in Midgestational Human Fetal Astrocytes: Implications for Phenotypic Identity. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *67*(4), 341–354. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31816a686d>
- Dringen, R., & Hirrlinger, J. (2003). Glutathione Pathways in the Brain. *Biological Chemistry*, *384*(4), 505–516. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.059>

- Dubey, A. K., Godbole, A., & Mathew, M. K. (2016). Regulation of VDAC trafficking modulates cell death. *Cell Death Discovery*, 2(1), 16085. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.85>
- Esposito, E., Capasso, M., di Tomasso, N., Corona, C., Pellegrini, F., Uncini, A., Vitaglione, P., Fogliano, V., Piantelli, M., & Sensi, S. L. (2007). Antioxidant strategies based on tomato-enriched food or pyruvate do not affect disease onset and survival in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research*, 1168(1), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.095>
- Essandoh, K., Yang, L., Wang, X., Huang, W., Qin, D., Hao, J., Wang, Y., Zingarelli, B., Peng, T., & Fan, G.-C. (2015). Blockade of exosome generation with GW4869 dampens the sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(11), 2362–2371. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.08.010>
- Fader, C. M., & Colombo, M. I. (2009). Autophagy and multivesicular bodies: Two closely related partners. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 70–78. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.168>
- Falchi, A. M., Sogos, V., Saba, F., Piras, M., Congiu, T., & Piludu, M. (2013). Astrocytes shed large membrane vesicles that contain mitochondria, lipid droplets and ATP. *Histochemistry and Cell Biology*, 139(2), 221–231. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1045-x>
- Fan, J., Kang, H.-B., Shan, C., Elf, S., Lin, R., Xie, J., Gu, T.-L., Aguiar, M., Lonning, S., Chung, T.-W., Arellano, M., Khoury, H. J., Shin, D. M., Khuri, F. R., Boggon, T. J., Kang, S., & Chen, J. (2014). Tyr-301 Phosphorylation Inhibits Pyruvate Dehydrogenase by Blocking Substrate Binding and Promotes the Warburg Effect. *Journal of Biological Chemistry*, 289(38), 26533–26541. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.593970>
- Fang, F., Kamel, F., Lichtenstein, P., Bellocco, R., Sparén, P., Sandler, D. P., & Ye, W. (2009). Familial aggregation of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 66(1), 94–99. <https://doi.org/10.1002/ana.21580>
- Fearon, C., Murray, B., & Mitsumoto, H. (2021). Disorders of Upper and Lower Motor Neurons. In N. Newman, J. Jankovic, J. Mazziotta, & S. Pomeroy (Eds.), *Bradley and Daroff's Neurology in Clinical Practice* (8th ed., pp. 1535–1567). Elsevier.
- Federici, C., Shahaj, E., Cecchetti, S., Camerini, S., Casella, M., Iessi, E., Camisaschi, C., Paolino, G., Calvieri, S., Ferro, S., Cova, A., Squarcina, P., Bertuccini, L., Iosi, F., Huber, V., & Lugini, L. (2020). Natural-Killer-Derived Extracellular Vesicles: Immune Sensors and Interactors. *Frontiers in Immunology*, 11(March), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00262>
- Ferriero, R., Iannuzzi, C., Manco, G., & Brunetti-Pierri, N. (2015). Differential inhibition of PDKs by phenylbutyrate and enhancement of pyruvate dehydrogenase complex activity by combination with dichloroacetate. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(5), 895–904. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9808-2>
- Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerød, L., Fisher, E. M. C., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H., & Simonsen, A. (2007). Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *Journal of Cell Biology*, 179(3), 485–500. <https://doi.org/10.1083/jcb.200702115>
- Franco, M. C., Ricart, K. C., Gonzalez, A. S., Dennys, C. N., Nelson, P. A., Janes, M. S., Mehl, R. A., Landar, A., & Estévez, A. G. (2015). Nitration of Hsp90 on Tyrosine 33 Regulates Mitochondrial Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 290(31), 19055–19066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.663278>
- Galloway, C. A., Lee, H., & Yoon, Y. (2012a). Mitochondrial morphology—emerging role in

- bioenergetics. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(12), 2218–2228. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.035>
- Galloway, C. A., Lee, H., & Yoon, Y. (2012b). Mitochondrial morphology—emerging role in bioenergetics. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(12), 2218–2228. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.035>
- Gandelman, M., Peluffo, H., Beckman, J. S., Cassina, P., & Barbeito, L. (2010). Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 7(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-33>
- Gane, E. J., Weilert, F., Orr, D. W., Keogh, G. F., Gibson, M., Lockhart, M. M., Frampton, C. M., Taylor, K. M., Smith, R. A. J., & Murphy, M. P. (2010). The mitochondria-targeted anti-oxidant mitoquinone decreases liver damage in a phase II study of hepatitis C patients. *Liver International*, 30(7), 1019–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02250.x>
- Gao, W., Liu, H., Yuan, J., Wu, C., Huang, D., Ma, Y., Zhu, J., Ma, L., Guo, J., Shi, H., Zou, Y., & Ge, J. (2016). Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis via membrane TNF- $\alpha$  mediated NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(12), 2318–2327. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12923>
- Garcia-Marcos, M., Peérez-Andrés, E., Tandel, S., Fontanils, U., Kumps, A., Kabré, E., Goémez-Muñoz, A., Marino, A., Dehay, J.-P., & Pochet, S. (2006). Coupling of two pools of P2X7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland. *Journal of Lipid Research*, 47(4), 705–714. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500408-JLR200>
- Gharbi, T., Zhang, Z., & Yang, G.-Y. (2020). The Function of Astrocyte Mediated Extracellular Vesicles in Central Nervous System Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(October), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.568889>
- Goetzl, E. J., Mustapic, M., Kapogiannis, D., Eitan, E., Lobach, I. V., Goetzl, L., Schwartz, J. B., & Miller, B. L. (2016). Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 30(11), 3853–3859. <https://doi.org/10.1096/fj.201600756R>
- Goetzl, E. J., Schwartz, J. B., Abner, E. L., Jicha, G. A., & Kapogiannis, D. (2018). High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, 83(3), 544–552. <https://doi.org/10.1002/ana.25172>
- Gong, Y. H., Parsadanian, A. S., Andreeva, A., Snider, W. D., & Elliott, J. L. (2000). Restricted Expression of G86R Cu/Zn Superoxide Dismutase in Astrocytes Results in Astrocytosis But Does Not Cause Motoneuron Degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 20(2), 660–665. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-02-00660.2000>
- Gordon, P. H., Moore, D. H., Miller, R. G., Florence, J. M., Verheijde, J. L., Doorish, C., Hilton, J. F., Spitalny, G. M., MacArthur, R. B., Mitsumoto, H., Neville, H. E., Boylan, K., Mozaffar, T., Belsh, J. M., Ravits, J., Bedlack, R. S., Graves, M. C., McCluskey, L. F., Barohn, R. J., & Tandan, R. (2007). Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurology*, 6(12), 1045–1053. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70270-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70270-3)
- Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., & Agnati, L. F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of Neural Transmission*, 117(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0288-8>
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J.,

- Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H.-X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R. L., & 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., Song, S., Likhite, S., Murtha, M. J., Foust, K. D., Rao, M., Eagle, A., Kammesheidt, A., Christensen, A., Mendell, J. R., Burghes, A. H. M., & 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>
- Hajrasouliha, A. R., Jiang, G., Lu, Q., Lu, H., Kaplan, H. J., Zhang, H.-G., & Shao, H. (2013). Exosomes from Retinal Astrocytes Contain Antiangiogenic Components That Inhibit Laser-induced Choroidal Neovascularization. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(39), 28058–28067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.470765>
- Halim, N. D., Mcfate, T., Mohyeldin, A., Okagaki, P., Korotchkina, L. G., Patel, M. S., Jeoung, N. H., Harris, R. A., Schell, M. J., & 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>
- Hanspal, M. A., Dobson, C. M., Yerbury, J. J., & Kumita, J. R. (2017). The relevance of contact-independent cell-to-cell transfer of TDP-43 and SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1863*(11), 2762–2771. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.007>
- Hassoun, E. A., & Cearfoss, J. (2011). Dichloroacetate- and trichloroacetate-induced modulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and glutathione level in the livers of mice after subacute and subchronic exposures. *Toxicological & Environmental Chemistry*, *93*(2), 332–344. <https://doi.org/10.1080/02772248.2010.509602>
- He, F., Antonucci, L., & Karin, M. (2020). NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. *Carcinogenesis*, *41*(4), 405–416. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa039>
- He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(13), 4777. <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>
- Henderson, C. E., Bloch-Gallego, E., & Camu, W. (1995). Purified embryonic motoneurons. In J. Cohen & G. Wilkin (Eds.), *Neural cell culture: a practical approach* (Issues 103–383165, pp. 69–80). Oxford University Press, USA.
- Heo, Y.-A. (2022). Sodium Phenylbutyrate and Ursodoxicoltaurine: First Approval. *CNS Drugs*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s40263-022-00945-x>
- 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>
- Hiromasa, Y., Fujisawa, T., Aso, Y., & Roche, T. E. (2004). Organization of the Cores of the Mammalian Pyruvate Dehydrogenase Complex Formed by E2 and E2 Plus the E3-binding Protein and Their Capacities to Bind the E1 and E3 Components. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(8), 6921–6933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308172200>
- Hitosugi, T., Fan, J., Chung, T.-W., Lythgoe, K., Wang, X., Xie, J., Ge, Q., Gu, T.-L., Polakiewicz, R. D., Roesel, J. L., Chen, G. Z., Boggon, T. J., Lonial, S., Fu, H., Khuri, F. R., Kang, S., & Chen, J. (2011).

- Tyrosine Phosphorylation of Mitochondrial Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Is Important for Cancer Metabolism. *Molecular Cell*, 44(6), 864–877.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.015>
- Hogg, M. C., Halang, L., Woods, I., Coughlan, K. S., & PREHN, J. H. M. (2018). Riluzole does not improve lifespan or motor function in three ALS mouse models. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 19(5–6), 438–445.  
<https://doi.org/10.1080/21678421.2017.1407796>
- Holness, M. J., Bulmer, K., Smith, N. D., & Sugden, M. C. (2003). Investigation of potential mechanisms regulating protein expression of hepatic pyruvate dehydrogenase kinase isoforms 2 and 4 by fatty acids and thyroid hormone. *Biochemical Journal*, 369(3), 687–695.  
<https://doi.org/10.1042/bj20021509>
- Howland, D. S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N. J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., DeGennaro, L. J., Cleveland, D. W., & 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*, 99(3), 1604–1609.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.032539299>
- Igoudjil, a., Magrane, J., Fischer, L. R., Kim, H. J., Hervias, I., Dumont, M., Cortez, C., Glass, J. D., Starkov, a. a., & Manfredi, G. (2011). In Vivo Pathogenic Role of Mutant SOD1 Localized in the Mitochondrial Intermembrane Space. *Journal of Neuroscience*, 31(44), 15826–15837.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1965-11.2011>
- Iguchi, Y., Eid, L., Parent, M., Soucy, G., Bareil, C., Riku, Y., Kawai, K., Takagi, S., Yoshida, M., Katsuno, M., Sobue, G., & Julien, J.-P. (2016). Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43. *Brain*, 139(12), 3187–3201. <https://doi.org/10.1093/brain/aww237>
- Iridoy, M., Zubiri, I., Zelaya, M., Martinez, L., Ausín, K., Lachen-Montes, M., Santamaría, E., Fernandez-Irigoyen, J., & Jericó, I. (2018). Neuroanatomical Quantitative Proteomics Reveals Common Pathogenic Biological Routes between Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Dementia (FTD). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 4.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20010004>
- Islam, A., Kagawa, Y., Miyazaki, H., Shil, S. K., Umaru, B. A., Yasumoto, Y., Yamamoto, Y., & Owada, Y. (2019). FABP7 Protects Astrocytes Against ROS Toxicity via Lipid Droplet Formation. *Molecular Neurobiology*, 56(8), 5763–5779. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1489-2>
- 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>
- Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M. J., Kaufman, E., & Sokoloff, L. (2003). *Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo*. 100(8), 4879–4884.
- Jan Groeneveld, G., Veldink, J. H., van der Tweel, I., Kalmijn, S., Beijer, C., de Visser, M., Wokke, J. H. J., Franssen, H., & Berg, L. H. van den. (2003). A randomized sequential trial of creatine in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 53(4), 437–445.  
<https://doi.org/10.1002/ana.10554>
- Jensen, B. K., McAvoy, K. J., Heinsinger, N. M., Lepore, A. C., Ilieva, H., Haeusler, A. R., Trotti, D., & Pasinelli, P. (2022). Targeting TNF $\alpha$  produced by astrocytes expressing amyotrophic lateral

- sclerosis-linked mutant fused in sarcoma prevents neurodegeneration and motor dysfunction in mice. *Glia*, *70*(7), 1426–1449. <https://doi.org/10.1002/glia.24183>
- Jha, M. K., Jeon, S., & Suk, K. (2012). Pyruvate Dehydrogenase Kinases in the Nervous System: Their Principal Functions in Neuronal-glial Metabolic Interaction and Neuro-metabolic Disorders. *Current Neuropharmacology*, *10*(4), 393–403. <https://doi.org/10.1007/BF01246756>
- Jiménez-Riani, M., Díaz-Amarilla, P., Isasi, E., Casanova, G., Barbeito, L., & Olivera-Bravo, S. (2017). Ultrastructural features of aberrant glial cells isolated from the spinal cord of paralytic rats expressing the amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1G93A mutation. *Cell and Tissue Research*, *370*(3), 391–401. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2681-1>
- Joshi, A. U., Minhas, P. S., Liddelow, S. A., Haileselassie, B., Andreasson, K. I., Dorn, G. W., & Mochly-Rosen, D. (2019). Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, *22*(10), 1635–1648. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0486-0>
- Julian, L., & Olson, M. F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK). *Small GTPases*, *5*(2), e29846. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29846>
- Jung, C., Higgins, C. M. J., & Xu, Z. (2002). Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, *83*(3), 535–545. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01112.x>
- Jung, H. H., Kim, J.-Y., Cho, E. Y., Oh, J. M., Lee, J. E., Kim, S. W., Nam, S. J., Park, Y. H., Ahn, J. S., & Im, Y.-H. (2021). Elevated Level of Nerve Growth Factor (NGF) in Serum-Derived Exosomes Predicts Poor Survival in Patients with Breast Cancer Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancers*, *13*(21), 5260. <https://doi.org/10.3390/cancers13215260>
- Kabashi, E., Valdmanis, P. N., Dion, P., & Rouleau, G. a. (2007). Oxidized/misfolded superoxide dismutase-1: the cause of all amyotrophic lateral sclerosis? *Annals of Neurology*, *62*(6), 553–559. <https://doi.org/10.1002/ana.21319>
- Kansanen, E., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Kuosmanen, S. M., Tong, K. I., Leinonen, H., Woodcock, S. R., Yamamoto, M., Carlberg, C., Ylä-Herttuala, S., Freeman, B. A., & Levenon, A.-L. (2011). Electrophilic Nitro-fatty Acids Activate NRF2 by a KEAP1 Cysteine 151-independent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(16), 14019–14027. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.190710>
- Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Leinonen, H., & Levenon, A.-L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*, *1*(1), 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>
- Katsetos, C. D., Del Valle, L., Geddes, J. F., Assimakopoulou, M., Legido, A., Boyd, J. C., Balin, B., Parikh, N. A., Maraziotis, T., de Chadarevian, J.-P., Varakis, J. N., Matsas, R., Spano, A., Frankfurter, A., Herman, M. M., & Khalili, K. (2001). Aberrant Localization of the Neuronal Class III  $\beta$ -Tubulin in Astrocytomas. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *125*(5), 613–624. <https://doi.org/10.5858/2001-125-0613-ALOTNC>
- Kaufmann, P., Thompson, J. L. P., Levy, G., Buchsbaum, R., Shefner, J., Krivickas, L. S., Katz, J., Rollins, Y., Barohn, R. J., Jackson, C. E., Tiryaki, E., Lomen-Hoerth, C., Armon, C., Tandan, R., Rudnicki, S. A., Reznia, K., Sufit, R., Pestronk, A., Novella, S. P., ... Levin, B. (2009). Phase II trial of CoQ10 for ALS finds insufficient evidence to justify phase III. *Annals of Neurology*, *66*(2), 235–244. <https://doi.org/10.1002/ana.21743>

- Kawamata, H., & Manfredi, G. (2010). Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(7–8), 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.05.003>
- Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., Gangoda, L., & Mathivanan, S. (2016). ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 688–692. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.019>
- Kelso, G. F., Porteous, C. M., Coulter, C. V., Hughes, G., Porteous, W. K., Ledgerwood, E. C., Smith, R. A. J., & Murphy, M. P. (2001). Selective Targeting of a Redox-active Ubiquinone to Mitochondria within Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 4588–4596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009093200>
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 89–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046>
- Kiernan, M. C., Vucic, S., Talbot, K., McDermott, C. J., Hardiman, O., Shefner, J. M., Al-Chalabi, A., Huynh, W., Cudkowicz, M., Talman, P., Van den Berg, L. H., Dharmadasa, T., Wicks, P., Reilly, C., & Turner, M. R. (2021). Improving clinical trial outcomes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 17(2), 104–118. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00434-z>
- Kim, M. J., Vargas, M. R., Harlan, B. A., Killoy, K. M., Ball, L. E., Comte-Walters, S., Gooz, M., Yamamoto, Y., Beckman, J. S., Barbeito, L., & Pehar, M. (2018). Nitration and Glycation Turn Mature NGF into a Toxic Factor for Motor Neurons: A Role for p75 NTR and RAGE Signaling in ALS. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(18), 1587–1602. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6966>
- Kirkinezos, I. G., Hernandez, D., Bradley, W. G., & Moraes, C. T. (2004). An ALS mouse model with a permeable blood-brain barrier benefits from systemic cyclosporine A treatment. *Journal of Neurochemistry*, 88(4), 821–826. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02181.x>
- Klivenyi, P., Ferrante, R. J., Matthews, R. T., Bogdanov, M. B., Klein, A. M., Andreassen, O. A., Mueller, G., Wermer, M., Kaddurah-Daouk, R., & Beal, M. F. (1999). Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Medicine*, 5(3), 347–350. <https://doi.org/10.1038/6568>
- Knoechel, T. R., Tucker, A. D., Robinson, C. M., Phillips, C., Taylor, W., Bungay, P. J., Kasten, S. a., Roche, T. E., & 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>
- Kolesnick, R., & Golde, D. W. (1994). The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell*, 77(3), 325–328. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90147-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90147-3)
- Kolobova, E., Tuganova, A., Boulatnikov, I., & Popov, K. M. (2001). Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochemical Journal*, 358(1), 69. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3580069>
- Lago-Baldaia, I., Fernandes, V. M., & Ackerman, S. D. (2020). More Than Mortar: Glia as Architects of Nervous System Development and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(December), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.611269>
- Lee, S., Lee, W.-H., Lee, M.-S., Mori, K., & Suk, K. (2012). Regulation by lipocalin-2 of neuronal cell



- death, migration, and morphology. *Journal of Neuroscience Research*, 90(3), 540–550. <https://doi.org/10.1002/jnr.22779>
- Lee, S., Park, J.-Y., Lee, W.-H., Kim, H., Park, H.-C., Mori, K., & Suk, K. (2009). Lipocalin-2 Is an Autocrine Mediator of Reactive Astrocytosis. *Journal of Neuroscience*, 29(1), 234–249. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5273-08.2009>
- Lenglet, T., Lacomblez, L., Abitbol, J. L., Ludolph, A., Mora, J. S., Robberecht, W., Shaw, P. J., Pruss, R. M., Cuvier, V., & Meininger, V. (2014). A phase II–III trial of olesoxime in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neurology*, 21(3), 529–536. <https://doi.org/10.1111/ene.12344>
- Leonard, A. P., Cameron, R. B., Speiser, J. L., Wolf, B. J., Peterson, Y. K., Schnellmann, R. G., Beeson, C. C., & Rohrer, B. (2015). Quantitative analysis of mitochondrial morphology and membrane potential in living cells using high-content imaging, machine learning, and morphological binning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(2), 348–360. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.002>
- Levy, M., Castillo, S. S., & Goldkorn, T. (2006). nSMase2 activation and trafficking are modulated by oxidative stress to induce apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(3), 900–905. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.013>
- Liddelw, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Lincecum, J. M., Vieira, F. G., Wang, M. Z., Thompson, K., De Zutter, G. S., Kidd, J., Moreno, A., Sanchez, R., Carrion, I. J., Levine, B. A., Al-Nakhala, B. M., Sullivan, S. M., Gill, A., & Perrin, S. (2010). From transcriptome analysis to therapeutic anti-CD40L treatment in the SOD1 model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 42(5), 392–399. <https://doi.org/10.1038/ng.557>
- Liu, B., Andrieu-Abadie, N., Levade, T., Zhang, P., Obeid, L. M., & Hannun, Y. a. (1998). Glutathione Regulation of Neutral Sphingomyelinase in Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11313–11320. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.11313>
- Liu, L., Zhang, K., Sandoval, H., Yamamoto, S., Jaiswal, M., Sanz, E., Li, Z., Hui, J., Graham, B. H., Quintana, A., & Bellen, H. J. (2015). Glial Lipid Droplets and ROS Induced by Mitochondrial Defects Promote Neurodegeneration. *Cell*, 160(1–2), 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.019>
- Liu, R., Li, B., Flanagan, S. W., Oberley, L. W., Gozal, D., & Qiu, M. (2002). Increased mitochondrial antioxidative activity or decreased oxygen free radical propagation prevent mutant SOD1-mediated motor neuron cell death and increase amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mouse survival. *Journal of Neurochemistry*, 80(3), 488–500. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00720.x>
- Losón, O. C., Song, Z., Chen, H., & Chan, D. C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular Biology of the Cell*, 24(5), 659–667. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-10-0721>
- Lydell, C. P., Chan, A., Wambolt, R. B., Sambandam, N., Parsons, H., Bondy, G. P., Rodrigues, B., Popov, K. M., Harris, R. A., Brownsey, R. W., & Allard, M. F. (2002). Pyruvate dehydrogenase and the regulation of glucose oxidation in hypertrophied rat hearts. *Cardiovascular Research*, 53(4), 841–851. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00560-0](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00560-0)

- Macara, I. G., Baldarelli, R., Field, C. M., Glotzer, M., Hayashi, Y., Hsu, S.-C., Kennedy, M. B., Kinoshita, M., Longtine, M., Low, C., Maltais, L. J., McKenzie, L., Mitchison, T. J., Nishikawa, T., Noda, M., Petty, E. M., Peifer, M., Pringle, J. R., Robinson, P. J., ... Zieger, B. (2002). Mammalian Septins Nomenclature. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(12), 4111–4113. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-07-0438>
- Magrane, 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>
- 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>
- Mao, H., Liu, J., Shi, W., Huang, Q., Xu, X., Ni, L., Zou, F., Shi, J., Li, D., Liu, Y., & Chen, J. (2013). The Expression Patterns of Septin-9 After Traumatic Brain Injury in Rat Brain. *Journal of Molecular Neuroscience*, *51*(2), 558–566. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0024-6>
- Martínez-Palma, L., Miquel, E., Lagos-Rodríguez, V., Barbeito, L., Cassina, A., & Cassina, P. (2019). Mitochondrial Modulation by Dichloroacetate Reduces Toxicity of Aberrant Glial Cells and Gliosis in the SOD1G93A Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*, *16*(1), 203–215. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0659-7>
- Mathieu, M., Névo, N., Jouve, M., Valenzuela, J. I., Maurin, M., Verweij, F. J., Palmulli, R., Lankar, D., Dingli, F., Loew, D., Rubinstein, E., Boncompain, G., Perez, F., & Théry, C. (2021). Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nature Communications*, *12*(1), 4389. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24384-2>
- Matthews, R. T., Yang, L., Browne, S., Baik, M., & Beal, M. F. (1998). Coenzyme Q 10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(15), 8892–8897. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8892>
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C. D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M. F., & 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>
- Menzies, F. M., Cookson, M. R., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., Dong, L., Figlewicz, D. A., & Shaw, P. J. (2002). Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, *125*(7), 1522–1533. <https://doi.org/10.1093/brain/awf167>
- Meyer, K., Ferraiuolo, L., Miranda, C. J., Likhite, S., McElroy, S., Renusch, S., Ditsworth, D., Lagier-Tourenne, C., Smith, R. A., Ravits, J., Burghes, A. H., Shaw, P. J., Cleveland, D. W., Kolb, S. J., & Kaspar, B. K. (2014). Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(2), 829–832. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314085111>
- Migheli, A., Cordera, S., Bendotti, C., Atzori, C., Piva, R., & Schiffer, D. (1999). S-100 $\beta$  protein is upregulated in astrocytes and motor neurons in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, *261*(1–2), 25–28. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)01001-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)01001-5)

- Miller, T., Cudkowicz, M., Shaw, P. J., Andersen, P. M., Atassi, N., Bucelli, R. C., Genge, A., Glass, J., Ladha, S., Ludolph, A. L., Maragakis, N. J., McDermott, C. J., Pestronk, A., Ravits, J., Salachas, F., Trudell, R., Van Damme, P., Zinman, L., Bennett, C. F., ... Ferguson, T. A. (2020). Phase 1–2 Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *New England Journal of Medicine*, *383*(2), 109–119. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2003715>
- Miquel, E., Cassina, A., Martínez-Palma, L., Bolatto, C., Trías, E., Gandelman, M., Radi, R., Barbeito, L., & Cassina, P. (2012). Modulation of Astrocytic Mitochondrial Function by Dichloroacetate Improves Survival and Motor Performance in Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE*, *7*(4), e34776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034776>
- Morten, K. J., Caky, M., & Matthews, P. M. (1998). Stabilization of the pyruvate dehydrogenase E1 subunit by dichloroacetate. *Neurology*, *51*(5), 1331–1335. <https://doi.org/10.1212/WNL.51.5.1331>
- Murphy, M. P., & Hartley, R. C. (2018). Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*(12), 865–886. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.174>
- Murphy, M. P., & Smith, R. A. . (2000). Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *41*(2), 235–250. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00069-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00069-1)
- 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>
- Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia Development and Function. *Annual Review of Immunology*, *32*(1), 367–402. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>
- Neuspiel, M., Schauss, A. C., Braschi, E., Zunino, R., Rippstein, P., Rachubinski, R. a., Andrade-Navarro, M. a., & McBride, H. M. (2008). Cargo-Selected Transport from the Mitochondria to Peroxisomes Is Mediated by Vesicular Carriers. *Current Biology*, *18*(2), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.038>
- Noël, G., Tham, D. K. L., MacVicar, B. A., & Moukhles, H. (2020). Agrin plays a major role in the coalescence of the aquaporin-4 clusters induced by gamma-1-containing laminin. *Journal of Comparative Neurology*, *528*(3), 407–418. <https://doi.org/10.1002/cne.24763>
- Noell, S., Fallier-Becker, P., Deutsch, U., Mack, A. F., & Wolburg, H. (2009). Agrin defines polarized distribution of orthogonal arrays of particles in astrocytes. *Cell and Tissue Research*, *337*(2), 185–195. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0812-z>
- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. In *Astrocytes* (Vol. 814, Issue 1, pp. 23–45). [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3)
- Obrador, E., Salvador-Palmer, R., López-Blanch, R., Jihad-Jebbar, A., Vallés, S. L., & Estrela, J. M. (2021). The Link between Oxidative Stress, Redox Status, Bioenergetics and Mitochondria in the Pathophysiology of ALS. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(12), 6352. <https://doi.org/10.3390/ijms22126352>
- Oka, T., Hikoso, S., Yamaguchi, O., Taneike, M., Takeda, T., Tamai, T., Oyabu, J., Murakawa, T., Nakayama, H., Nishida, K., Akira, S., Yamamoto, A., Komuro, I., & Otsu, K. (2012). Mitochondrial

- DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature*, 485(7397), 251–255. <https://doi.org/10.1038/nature10992>
- Olzmann, J. A., & Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 137–155. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>
- Ots, H. D., Tracz, J. A., Vinokuroff, K. E., & Musto, A. E. (2022). CD40–CD40L in Neurological Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4115. <https://doi.org/10.3390/ijms23084115>
- Paganoni, S., Macklin, E. A., Hendrix, S., Berry, J. D., Elliott, M. A., Maiser, S., Karam, C., Caress, J. B., Owegi, M. A., Quick, A., Wymer, J., Goutman, S. A., Heitzman, D., Heiman-Patterson, T., Jackson, C. E., Quinn, C., Rothstein, J. D., Kasarskis, E. J., Katz, J., ... Cudkovicz, M. E. (2020). Trial of Sodium Phenylbutyrate–Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 383(10), 919–930. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1916945>
- Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S. T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., Boutillier, A.-L., Zoll, J., Echaniz-Laguna, A., Loeffler, J.-P., & 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 Molecular Medicine*, 7(5), 526–546. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404433>
- Park, J.-H., Hong, Y.-H., Kim, H.-J., Kim, S.-M., Kim, M.-J., Park, K.-S., Sung, J.-J., & Lee, K.-W. (2007). Pyruvate slows disease progression in a G93A SOD1 mutant transgenic mouse model. *Neuroscience Letters*, 413(3), 265–269. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.11.058>
- Patel, M. S., & Korotchkina, L. G. (2006). Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), 217. <https://doi.org/10.1042/BST20060217>
- Patel, M. S., & Roche, T. E. (1990). Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes 1. *The FASEB Journal*, 4(14), 3224–3233. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.14.2227213>
- Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J. S., Estévez, A. G., & Barbeito, L. (2004). Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 89(2), 464–473. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02357.x>
- Pehar, M., Vargas, M. R., Robinson, K. M., Cassina, P., England, P., Beckman, J. S., Alzari, P. M., & Barbeito, L. (2006). Peroxynitrite transforms nerve growth factor into an apoptotic factor for motor neurons. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(11), 1632–1644. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.08.010>
- Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50(4), 427–434. <https://doi.org/10.1002/glia.20207>
- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (2012). Sweet Sixteen for ANLS. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(7), 1152–1166. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.149>
- Pharaoh, G., Sataranatarajan, K., Street, K., Hill, S., Gregston, J., Ahn, B., Kinter, C., Kinter, M., & Van Remmen, H. (2019). Metabolic and Stress Response Changes Precede Disease Onset in the Spinal Cord of Mutant SOD1 ALS Mice. *Frontiers in Neuroscience*, 13(MAY), 487. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00487>
- Phatnani, H., & Maniatis, T. (2015). Astrocytes in Neurodegenerative Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(6), a020628. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020628>

- Philips, T., & Rothstein, J. D. (2015). Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current Protocols in Pharmacology*, *69*(1), 5.67.1-5.67.21. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0567s69>
- Pramatarova, A., Laganière, J., Roussel, J., Brisebois, K., & Rouleau, G. A. (2001). Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase 1 in Transgenic Mice Does Not Lead to Motor Impairment. *The Journal of Neuroscience*, *21*(10), 3369–3374. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-10-03369.2001>
- Proia, P., Schiera, G., Mineo, M., Ingrassia, A., Santoro, G., Savettieri, G., & Di Liegro, I. (2008). Astrocytes shed extracellular vesicles that contain fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor. *International Journal of Molecular Medicine*, *21*(1), 63–67. <https://doi.org/10.3892/ijmm.21.1.63>
- Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(23), 5839–5848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>
- Radi, R., Cassina, A., & Hodara, R. (2002). Nitric Oxide and Peroxynitrite Interactions with Mitochondria. *Biological Chemistry*, *383*(3–4), 401–409. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.044>
- 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)
- Rahman, M. H., Bhusal, A., Kim, J.-H., Jha, M. K., Song, G. J., Go, Y., Jang, I.-S., Lee, I.-K., & Suk, K. (2020). Astrocytic pyruvate dehydrogenase kinase-2 is involved in hypothalamic inflammation in mouse models of diabetes. *Nature Communications*, *11*(1), 5906. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19576-1>
- 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>
- Raoul, C., Estévez, A. G., Nishimune, H., Cleveland, D. W., DeLapeyrière, O., Henderson, C. E., Haase, G., & Pettmann, B. (2002). Motoneuron Death Triggered by a Specific Pathway Downstream of Fas. *Neuron*, *35*(6), 1067–1083. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00905-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00905-4)
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, *200*(4), 373–383. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=23420871](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23420871)
- Renne, M. F., & Hariri, H. (2021). Lipid Droplet-Organellar Contact Sites as Hubs for Fatty Acid Metabolism, Trafficking, and Metabolic Channeling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.726261>
- Rodriguez-Cuenca, S., Cochemé, H. M., Logan, A., Abakumova, I., Prime, T. a., Rose, C., Vidal-Puig, A., Smith, A. C., Rubinsztein, D. C., Fearnley, I. M., Jones, B. a., Pope, S., Heales, S. J. R., Lam, B. Y. H., Neogi, S. G., McFarlane, I., James, A. M., Smith, R. A. J., & Murphy, M. P. (2010). Consequences of long-term oral administration of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ to wild-type mice. *Free Radical Biology and Medicine*, *48*(1), 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.039>
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. a, Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J.,

- O'Regan, J. P., Deng, H.-X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S. M., Berger, R., Tanzi, R. E., Halperin, J. J., Herzfeldt, B., ... 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>
- Rosenfeld, J., King, R. M., Jackson, C. E., Bedlack, R. S., Barohn, R. J., Dick, A., Phillips, L. H., Chapin, J., Gelinas, D. F., & Lou, J.-S. (2008). Creatine monohydrate in ALS: Effects on strength, fatigue, respiratory status and ALSFRS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, *9*(5), 266–272. <https://doi.org/10.1080/17482960802028890>
- Rossi, D. (2015). Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. *Progress in Neurobiology*, *130*, 86–120. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.04.003>
- Rossmann, M. J., Santos-Parker, J. R., Steward, C. A. C., Bispham, N. Z., Cuevas, L. M., Rosenberg, H. L., Woodward, K. A., Chonchol, M., Gioscia-Ryan, R. A., Murphy, M. P., & Seals, D. R. (2018). Chronic Supplementation With a Mitochondrial Antioxidant (MitoQ) Improves Vascular Function in Healthy Older Adults. *Hypertension*, *71*(6), 1056–1063. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10787>
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., & Freeman, B. A. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(42), 26066–26075. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47160-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47160-8)
- Ryan, M., Heverin, M., McLaughlin, R. L., & Hardiman, O. (2019). Lifetime Risk and Heritability of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurology*, *76*(11), 1367–1374. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.2044>
- Ryu, H., Smith, K., Camelo, S. I., Carreras, I., Lee, J., Iglesias, A. H., Dangond, F., Cormier, K. A., Cudkovic, M. E., H. Brown, R., & Ferrante, R. J. (2005). Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of Neurochemistry*, *93*(5), 1087–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03077.x>
- Saneto, R., & 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.
- Sauvanet, C., Duvezin-Caubet, S., di Rago, J.-P., & Rojo, M. (2010). Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *21*(6), 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.12.006>
- Sbai, O., Ould-Yahoui, A., Ferhat, L., Gueye, Y., Bernard, A., Charrat, E., Mehanna, A., Risso, J.-J., Chauvin, J.-P., Fenouillet, E., Rivera, S., & Khrestchatsky, M. (2010). Differential vesicular distribution and trafficking of MMP-2, MMP-9, and their inhibitors in astrocytes. *Glia*, *58*(3), 344–366. <https://doi.org/10.1002/glia.20927>
- Serrano, A., Donno, C., Giannetti, S., Perić, M., Andjus, P., D'Ambrosi, N., Michetti, F., D'Ambrosi, N., & Michetti, F. (2017). The Astrocytic S100B Protein with Its Receptor RAGE Is Aberrantly Expressed in SOD1 G93A Models, and Its Inhibition Decreases the Expression of Proinflammatory Genes. *Mediators of Inflammation*, *2017*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2017/1626204>

- Shah, R., Patel, T., & Freedman, J. E. (2018). Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. *New England Journal of Medicine*, 379(10), 958–966. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1704286>
- Sharma, P., & Roy, K. (2020). ROCK-2-selective targeting and its therapeutic outcomes. *Drug Discovery Today*, 25(2), 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.11.017>
- Shefner, J. M., Cudkowicz, M. E., Schoenfeld, D., Conrad, T., Taft, J., Chilton, M., Urbinelli, L., Qureshi, M., Zhang, H., Pestronk, a, Caress, J., Donofrio, P., Sorenson, E., Bradley, W., Lomen-Hoerth, C., Piro, E., Reznia, K., Ross, M., Pascuzzi, R., ... Consortium, N. (2004). A clinical trial of creatine in ALS. *Neurology*, 63(9), 1656–1661. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000142992.81995.F0>
- Shill, D. D., Southern, W. M., Willingham, T. B., Lansford, K. A., McCully, K. K., & Jenkins, N. T. (2016). Mitochondria-specific antioxidant supplementation does not influence endurance exercise training-induced adaptations in circulating angiogenic cells, skeletal muscle oxidative capacity or maximal oxygen uptake. *The Journal of Physiology*, 594(23), 7005–7014. <https://doi.org/10.1113/JP272491>
- Shoshan-Barmatz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., & Arbel, N. (2010). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(3), 227–285. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.03.002>
- Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6466. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- Siklós, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R. G., Joó, F., & Appel, S. H. (1996). Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 39(2), 203–216. <https://doi.org/10.1002/ana.410390210>
- Silverman, J. M., Christy, D., Shyu, C. C., Moon, K.-M., Fernando, S., Gidden, Z., Cowan, C. M., Ban, Y., Stacey, R. G., Grad, L. I., McAlary, L., Mackenzie, I. R., Foster, L. J., & Cashman, N. R. (2019). CNS-derived extracellular vesicles from superoxide dismutase 1 (SOD1)<sup>G93A</sup> ALS mice originate from astrocytes and neurons and carry misfolded SOD1. *Journal of Biological Chemistry*, 294(10), 3744–3759. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004825>
- Silverman, J. M., Fernando, S. M., Grad, L. I., Hill, A. F., Turner, B. J., Yerbury, J. J., & Cashman, N. R. (2016). Disease Mechanisms in ALS: Misfolded SOD1 Transferred Through Exosome-Dependent and Exosome-Independent Pathways. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 377–381. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0294-3>
- Smith, E. F., Shaw, P. J., & De Vos, K. J. (2019). The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 710, 132933. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.052>
- Smith, R. A. J., & Murphy, M. P. (2010). Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201(1), 96–103. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05627.x>
- Smolič, T., Tavčar, P., Horvat, A., Černe, U., Halužan Vasle, A., Tratnjek, L., Kreft, M. E., Scholz, N., Matis, M., Petan, T., Zorec, R., & Vardjan, N. (2021). Astrocytes in stress accumulate lipid droplets. *Glia*, February, 1–23. <https://doi.org/10.1002/glia.23978>
- Smolič, T., Zorec, R., & Vardjan, N. (2021). Pathophysiology of Lipid Droplets in Neuroglia. *Antioxidants*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.3390/antiox11010022>
- Snow, B. J., Rolfe, F. L., Lockhart, M. M., Frampton, C. M., O'Sullivan, J. D., Fung, V., Smith, R. A. J.,

- Murphy, M. P., & Taylor, K. M. (2010). A double-blind, placebo-controlled study to assess the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ as a disease-modifying therapy in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 25(11), 1670–1674. <https://doi.org/10.1002/mds.23148>
- Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends in Immunology*, 41(9), 758–770. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.004>
- 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>
- Soubannier, V., McLelland, G.-L., Zunino, R., Braschi, E., Rippstein, P., Fon, E. A., & McBride, H. M. (2012). A Vesicular Transport Pathway Shuttles Cargo from Mitochondria to Lysosomes. *Current Biology*, 22(2), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.057>
- Soubannier, V., Rippstein, P., Kaufman, B. a., Shoubridge, E. a., & McBride, H. M. (2012). Reconstitution of Mitochondria Derived Vesicle Formation Demonstrates Selective Enrichment of Oxidized Cargo. *PLoS ONE*, 7(12), e52830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052830>
- 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>
- Stacpoole, P. W., Martyniuk, C. J., James, M. O., & Calcutt, N. A. (2019). Dichloroacetate-induced peripheral neuropathy. In P. Fernyhough & N. A. Calcutt (Eds.), *International Review of Neurobiology* (1st ed., Vol. 145, pp. 211–238). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2019.05.003>
- Sugiura, A., McLelland, G., Fon, E. A., & McBride, H. M. (2014). A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *The EMBO Journal*, 33(19), 2142–2156. <https://doi.org/10.15252/embj.201488104>
- Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C. I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., Goda, N., Rahimi, Y., Johnson, R. S., Soga, T., Hirao, A., Suematsu, M., & Suda, T. (2013). Regulation of Glycolysis by Pdk Functions as a Metabolic Checkpoint for Cell Cycle Quiescence in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 12(1), 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.011>
- Taylor, A. R., Robinson, M. B., Gifondorwa, D. J., Tytell, M., & Milligan, C. E. (2007). Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: Role of signaling kinases. *Developmental Neurobiology*, 67(13), 1815–1829. <https://doi.org/10.1002/dneu.20559>
- Tefera, T. W., & Borges, K. (2017). Metabolic Dysfunctions in Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathogenesis and Potential Metabolic Treatments. *Frontiers in Neuroscience*, 10(JAN). <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00611>
- Tefera, T. W., Wong, Y., Barkl-Luke, M. E., Ngo, S. T., Thomas, N. K., McDonald, T. S., & Borges, K. (2016). Triheptanoin protects motor neurons and delays the onset of motor symptoms in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, 11(8), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161816>
- The ALSUntangled Group. (2013). ALS Untangled No. 20: The Deanna Protocol. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 14(4), 319–323. <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.788405>
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of



Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1), 3.22.1-3.22.29. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>

- Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 8, pp. 581–593). Nat Rev Immunol. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Tönges, L., Günther, R., Suhr, M., Jansen, J., Balck, A., Saal, K.-A., Barski, E., Nientied, T., Götz, A. A., Koch, J.-C., Mueller, B. K., Weishaupt, J. H., Sereda, M. W., Hanisch, U.-K., Bähr, M., & Lingor, P. (2014). Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*, 62(2), 217–232. <https://doi.org/10.1002/glia.22601>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science*, 319(5867), 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00131>
- Trostchansky, A., Souza, J. M., Ferreira, A., Ferrari, M., Blanco, F., Trujillo, M., Castro, D., Cerecetto, H., Baker, P. R. S., O'Donnell, V. B., & Rubbo, H. (2007). Synthesis, Isomer Characterization, and Anti-Inflammatory Properties of Nitroarachidonate. *Biochemistry*, 46(15), 4645–4653. <https://doi.org/10.1021/bi602652j>
- Vahsen, B. F., Gray, E., Thompson, A. G., Ansorge, O., Anthony, D. C., Cowley, S. A., Talbot, K., & Turner, M. R. (2021). Non-neuronal cells in amyotrophic lateral sclerosis — from pathogenesis to biomarkers. *Nature Reviews Neurology*, 17(6), 333–348. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00487-8>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- 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 Harten, A. C. M., Phatnani, H., & Przedborski, S. (2021). Non-cell-autonomous pathogenic mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends in Neurosciences*, 44(8), 658–668. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.04.008>
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Vande Velde, C., Miller, T. M., Cashman, N. R., & Cleveland, D. W. (2008). Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 4022–4027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712209105>
- Varcianna, A., Myszczyńska, M. A., Castelli, L. M., O'Neill, B., Kim, Y., Talbot, J., Nyberg, S., Nyamali, I., Heath, P. R., Stopford, M. J., Hautbergue, G. M., & Ferraiuolo, L. (2019). Micro-RNAs secreted through astrocyte-derived extracellular vesicles cause neuronal network degeneration in

C9orf72 ALS. *EBioMedicine*, 40, 626–635. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.067>

- Vardjan, N., Parpura, V., Verkhatsky, A., & Zorec, R. (2019). Gliocrine System: Astroglia as Secretory Cells of the CNS. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1175, 93–115. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_4)
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 280(27), 25571–25579. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501920200>
- Vázquez, M. C., Ketzoian, C., Legnani, C., Rega, I., Sánchez, N., Perna, A., Penela, M., Aguirrezábal, X., Druet-Cabanac, M., & 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>
- Velebit, J., Horvat, A., Smolič, T., Prpar Mihevc, S., Rogelj, B., Zorec, R., & Vardjan, N. (2020). Astrocytes with TDP-43 inclusions exhibit reduced noradrenergic cAMP and Ca<sup>2+</sup> signaling and dysregulated cell metabolism. *Scientific Reports*, 10(1), 6003. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62864-5>
- Verkhatsky, A. (2010). Physiology of neuronal–glial networking. *Neurochemistry International*, 57(4), 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.02.002>
- Verkhatsky, A., Ho, M. S., Zorec, R., & Parpura, V. (2019). The concept of neuroglia. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1175, pp. 1–13). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_1)
- Verkhatsky, A., Sofroniew, M. V, Messing, A., DeLanerolle, N. C., Rempe, D., Rodríguez, J. J., & Nedergaard, M. (2012). Neurological Diseases as Primary Gliopathies: A Reassessment of Neurocentrism. *ASN Neuro*, 4(3), AN20120010. <https://doi.org/10.1042/AN20120010>
- Vijayvergiya, C. (2005). Mutant Superoxide Dismutase 1 Forms Aggregates in the Brain Mitochondrial Matrix of Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *Journal of Neuroscience*, 25(10), 2463–2470. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4385-04.2005>
- Villacorta, L., Zhang, J., Garcia-Barrio, M. T., Chen, X., Freeman, B. a, Chen, Y. E., & Cui, T. (2007). Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(1), H770-6. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00261.2007>
- von Bartheld, C. S., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *Journal of Comparative Neurology*, 524(18), 3865–3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>

- Wang, G., Dinkins, M., He, Q., Zhu, G., Poirier, C., Campbell, A., Mayer-Proschel, M., & Bieberich, E. (2012). Astrocytes Secrete Exosomes Enriched with Proapoptotic Ceramide and Prostate Apoptosis Response 4 (PAR-4). *Journal of Biological Chemistry*, *287*(25), 21384–21395. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.340513>
- Wang, S., Cesca, F., Loers, G., Schweizer, M., Buck, F., Benfenati, F., Schachner, M., & Kleene, R. (2011). Synapsin I Is an Oligomannose-Carrying Glycoprotein, Acts As an Oligomannose-Binding Lectin, and Promotes Neurite Outgrowth and Neuronal Survival When Released via Glia-Derived Exosomes. *Journal of Neuroscience*, *31*(20), 7275–7290. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6476-10.2011>
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). The Metabolism Of Tumors In The Body. *Journal of General Physiology*, *8*(6), 519–530. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>
- Wenceslau, C. F., Szasz, T., McCarthy, C. G., Baban, B., NeSmith, E., & Webb, R. C. (2016). Mitochondrial N-formyl peptides cause airway contraction and lung neutrophil infiltration via formyl peptide receptor activation. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, *37*, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2016.02.005>
- Westrate, L. M., Drocco, J. A., Martin, K. R., Hlavacek, W. S., & MacKeigan, J. P. (2014). Mitochondrial Morphological Features Are Associated with Fission and Fusion Events. *PLoS ONE*, *9*(4), e95265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095265>
- 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>
- Won, J.-S., Im, Y.-B., Khan, M., Singh, A. K., & Singh, I. (2003). The role of neutral sphingomyelinase produced ceramide in lipopolysaccharide-mediated expression of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Neurochemistry*, *88*(3), 583–593. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02165.x>
- Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sisodia, S. S., Cleveland, D. W., & Price, D. L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, *14*(6), 1105–1116. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90259-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90259-7)
- Woodcock, S. R., Bonacci, G., Gelhaus, S. L., & Schopfer, F. J. (2013). Nitrated fatty acids: synthesis and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, *59*, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.015>
- Wu, A. S., Kiaei, M., Aguirre, N., Crow, J. P., Calingasan, N. Y., Browne, S. E., & Beal, M. F. (2003). Iron porphyrin treatment extends survival in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, *85*(1), 142–150. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01639.x>
- Xu, D., Liu, A., Wang, X., Chen, Y., Shen, Y., Tan, Z., & Qiu, M. (2018). Repression of Septin9 and Septin2 suppresses tumor growth of human glioblastoma cells. *Cell Death & Disease*, *9*(5), 514. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0547-4>
- Xu, J.-X. (2004). Radical Metabolism Is Partner to Energy Metabolism in Mitochondria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1011*(1), 57–60. <https://doi.org/10.1196/annals.1293.006>
- Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E. A., Garcia, M. L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O. R., Cleveland, D. W., & Goldstein, L. S. B. (2008). Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and

- oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(21), 7594–7599. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802556105>
- Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., & Hauser, C. J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 464(7285), 104–107. <https://doi.org/10.1038/nature08780>
- Zhang, W., Zhang, S.-L., Hu, X., & Tam, K. Y. (2015). Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target? *International Journal of Biological Sciences*, 11(12), 1390–1400. <https://doi.org/10.7150/ijbs.13325>
- Zhao, X., Li, S., Mo, Y., Li, R., Huang, S., Zhang, A., Ni, X., Dai, Q., & Wang, J. (2021). DCA Protects against Oxidation Injury Attributed to Cerebral Ischemia-Reperfusion by Regulating Glycolysis through PDK2-PDH-Nrf2 Axis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2021/5173035>
- Zhu, L., Kalimuthu, S., Gangadaran, P., Oh, J. M., Lee, H. W., Baek, S. H., Jeong, S. Y., Lee, S.-W., Lee, J., & Ahn, B.-C. (2017). Exosomes Derived From Natural Killer Cells Exert Therapeutic Effect in Melanoma. *Theranostics*, 7(10), 2732–2745. <https://doi.org/10.7150/thno.18752>
- Zhu, S., Stavrovskaya, I. G., Drozda, M., Kim, B. Y. S., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A. S., Hartley, D. M., Wu, D. C., Gullans, S., Ferrante, R. J., Przedborski, S., Kristal, B. S., & Friedlander, R. M. (2002). Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, 417(6884), 74–78. <https://doi.org/10.1038/417074a>

## ANEXO 1: OTRAS PUBLICACIONES

Además de las publicaciones que formaron parte de esta tesis, durante el desarrollo de esta tesis también participé en otros trabajos, ya sea de nuestro grupo o de colaboraciones con otros grupos de investigación. Se detallan a continuación los artículos publicados:

- 1) 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*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00131>
- 2) Martínez-Palma, L., Miquel, E., Lagos-Rodríguez, V., Barbeito, L., Cassina, A., & Cassina, P. (2019). Mitochondrial Modulation by Dichloroacetate Reduces Toxicity of Aberrant Glial Cells and Gliosis in the SOD1G93A Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*, *16*(1), 203–215. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0659-7>
- 3) Marton, S., González, B., Rodríguez-Bottero, S., Miquel, E., Martínez-Palma, L., Pazos, M., Prieto, J. P., Rodríguez, P., Sames, D., Seoane, G., Scorza, C., Cassina, P., & Carrera, I. (2019). Ibogaine Administration Modifies GDNF and BDNF Expression in Brain Regions Involved in Mesocorticolimbic and Nigral Dopaminergic Circuits. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 193. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00193>
- 4) Lagos-Rodríguez, V., Martínez-Palma, L., Marton, S., Miquel, E., Escobar-Pintos, R., Cassina, A., Lago, N., & Cassina, P. (2020). Mitochondrial bioenergetics, glial reactivity, and pain-related behavior can be restored by dichloroacetate treatment in rodent pain models. *Pain*, *161*(12), 2786–2797. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001992>
- 5) Cassina, P., Miquel, E., Martínez-Palma, L., & Cassina, A. (2021). Glial Metabolic Reprogramming in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuroimmunomodulation*, *28*(4), 204–212. <https://doi.org/10.1159/000516926>

Manuscrito en preparación: Marton, S., Miquel, E., Acosta, J., Cassina, P. SOD1G93A astrocyte-derived extracellular vesicles induce motor neuron death by a miRNA155-5p mediated mechanism. *International Journal of Molecular Sciences* (en preparación).

## ANEXO 2: FIGURAS SUPLEMENTARIAS

