

Tesis de Maestría

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área Biología, subárea Biología Celular y Molecular

Modulación de la actividad mitocondrial glial como estrategia terapéutica en modelos de Esclerosis Lateral Amiotrófica

Lic. Ernesto Miquel

Orientadora:

Dra. Patricia Cassina

Departamento de Histología y Embriología

Facultad de Medicina, Universidad de la República

Tribunal:

Presidente: Dr. Flavio Zolessi

Vocales: Dra. Giselle Prunell

Dra. Florencia Irigoien

Montevideo, septiembre de 2013

Agradecimientos

A Patricia Cassina, por abrirme las puertas de su laboratorio y orientar este trabajo y muchos otros.

A mis compañeros de laboratorio: Los de siempre, Laura Martínez y Hugo Peluffo, de quienes tanto he aprendido en estos años. Y los más nuevos, Sebastián Rodríguez y Valentina Lagos, que siempre están presentes para dar una mano.

A Adriana Cassina, por todo lo que me ha enseñado sobre las mitocondrias y su ayuda con los experimentos de respiración.

A Mariela González, por su asistencia con las técnicas histológicas.

A todos los compañeros del Departamento de Histología y Embriología. Especialmente a Carmen Bolatto y Rossana Sapiro, a quienes frecuentemente les he pedido consejos y ayuda con reactivos y equipos.

A los miembros del tribunal: Flavio Zolessi, Giselle Prunell y Florencia Irigoín, por aceptar corregir esta tesis.

A Elli.

Índice

Resumen	4
Introducción	
Esclerosis Lateral Amiotrófica	5
Participación de los astrocitos en la ELA	6
Alteraciones mitocondriales en la ELA	9
Disfunción mitocondrial en los astrocitos	12
Terapéutica dirigida hacia las mitocondrias en la ELA	13
Dicloroacetato	13
Hipótesis y Objetivos	16
Estrategia de investigación	17
Materiales y métodos	
Materiales	18
Protocolos de experimentación animal	18
Animales	18
Cultivos celulares	19
Tratamiento de los cultivos y conteo de motoneuronas	21
Tratamiento de los ratones con dicloroacetato	22
Análisis histológico e inmunofluorescencia	23
Conteo de motoneuronas y medida de astrogliosis en la médula espinal	24
Consumo de oxígeno	24
Pruebas funcionales	26
Estadística	26
Resultados	
El tratamiento con DCA recupera la actividad mitocondrial de los astrocitos SOD1 ^{G93A}	27
El DCA previene la toxicidad de los astrocitos SOD1 ^{G93A} hacia motoneuronas	29
El DCA mejora la función mitocondrial en la médula espinal de los ratones SOD1 ^{G93A}	30
El tratamiento con DCA reduce la pérdida de motoneuronas y la reactividad astrocitaria en la médula espinal de los ratones SOD1 ^{G93A}	31
El tratamiento con DCA aumenta la supervivencia de ratones SOD1 ^{G93A}	33
El tratamiento con DCA no retrasa el inicio de síntomas de los ratones SOD1 ^{G93A}	35
El DCA mejora el desempeño motor de los ratones SOD1 ^{G93A}	37
Discusión	
Disfunción mitocondrial en astrocitos y toxicidad	41
DCA y modulación metabólica	42
Modulación mitocondrial in vivo	44
Efectos del DCA sobre otros tipos celulares	47
Uso potencial del DCA en otras enfermedades neurodegenerativas	48
Conclusión	48
Perspectivas	49
Publicaciones	51
Referencias	52

Resumen

La disfunción mitocondrial es uno de los mecanismos patogénicos que contribuyen a la neurodegeneración en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Los astrocitos que expresan la mutación SOD1^{G93A} vinculada a la ELA presentan una capacidad respiratoria mitocondrial reducida asociada a un aumento en la capacidad proliferativa y cambios fenotípicos que los vuelven inductores de la muerte de motoneuronas. La toxicidad mediada por astrocitos se puede prevenir utilizando antioxidantes dirigidos a la mitocondria, lo que indica un rol crítico de las mitocondrias en el fenotipo neurotóxico. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si drogas utilizadas para estimular el metabolismo mitocondrial podrían revertir el efecto tóxico y eventualmente modular la progresión de la ELA. En este trabajo, estudiamos en modelos de ELA los efectos del dicloroacetato (DCA), una droga que mejora el estado funcional de las mitocondrias mediante la estimulación de la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) por inhibición de su fosforilación. El tratamiento con DCA de astrocitos en cultivo aislados de ratas que expresan la mutación SOD1^{G93A} mejoró el acoplamiento mitocondrial y previno la toxicidad de los astrocitos SOD1^{G93A} hacia las motoneuronas en cocultivo. La administración crónica de DCA en el agua de beber de ratones que expresan la mutación SOD1^{G93A} aumentó su supervivencia en dos semanas comparados con ratones no tratados. La administración sistémica de DCA también normalizó los valores reducidos de actividad mitocondrial en la médula espinal lumbar de ratones SOD1^{G93A}. Un efecto interesante del DCA fue la mejora en el desempeño motor durante la prueba de fuerza de agarre en las últimas etapas de la enfermedad. El DCA sistémico también redujo la reactividad astrocitaria y previno la muerte de neuronas en la médula espinal de ratones SOD1^{G93A}. En conjunto, estos hallazgos indican que la mejora de la función mitocondrial utilizando DCA retarda el desarrollo de los síntomas motores, lo cual apoya el potencial terapéutico de drogas dirigidas a la mitocondria en la ELA.

Introducción

Esclerosis Lateral Amiotrófica

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, es una enfermedad neurodegenerativa mortal de causa desconocida caracterizada por la muerte selectiva de las motoneuronas tanto superiores (corteza motora) como inferiores (tronco cerebral y médula espinal). Los pacientes muestran síntomas progresivos de espasticidad, hiperreflexia, debilidad y parálisis muscular, y la enfermedad conduce a la muerte entre los 2 a 5 años de realizado el diagnóstico, en la mayoría de los casos debido a fallos respiratorios. Su incidencia anual varía entre 0,31 a 3,2 cada 100.000 personas (1,37 en Uruguay; (Vazquez et al., 2008)) y se manifiesta en la vida adulta, generalmente en la sexta década de vida. No tiene tratamiento curativo y la única terapia aprobada es el tratamiento con riluzol, droga que extiende la vida de los pacientes tan sólo 3 a 6 meses en promedio (Miller et al., 2007).

La enfermedad puede presentarse en su forma esporádica (ELAE) o familiar (ELAF). En la primera, que comprende el 90% de los casos, no existe un componente genético conocido. El restante 10% de los casos de ELA son de causa familiar, de los cuales el 20% se asocia a mutaciones en la enzima antioxidante superóxido dismutasa-1 (Cu-Zn superóxido dismutasa; SOD1)(Rosen et al., 1993). El comportamiento de la enfermedad es indistinguible de los casos esporádicos (Rowland and Shneider, 2001).

El descubrimiento de las mutaciones en la enzima SOD1 han permitido la creación de animales transgénicos que expresan esta enzima mutada, los cuales experimentan síntomas motores similares a la enfermedad humana y han resultado de gran utilidad como modelos de experimentación dadas las pronunciadas similitudes patológicas y clínicas entre pacientes con ELAE y ELAF (Gurney et al., 1994). Se han creado numerosas cepas de ratas y ratones que expresan la SOD1 humana con distintas mutaciones asociadas a ELAF y variados niveles de expresión de las mismas. 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 (SOD1^{G93A}), 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 (seis en la rata) y la muerte ocurre aproximadamente un mes más tarde. Recientemente se han desarrollado modelos animales de ELA basados en mutaciones de genes menos representadas en la ELAF que la SOD1 (revisados en (Vande Velde et al., 2011)), como las proteínas TDP-43 y FUS, 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 sus mecanismos patogénicos, las que involucran al estrés oxidativo, la excitotoxicidad mediada por glutamato, anormalidades del citoesqueleto, mal plegamiento y agregación proteica intracelular, disfunción mitocondrial, autoinmunidad, alteración del soporte trófico y exposición a tóxicos ambientales (Rowland and Shneider, 2001; Bruijn et al., 2004).

Participación de los astrocitos en la ELA

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, en los últimos años se ha expandido notablemente nuestro conocimiento sobre la participación de la glia en la fisiología del sistema nervioso y en las enfermedades neurodegenerativas.

Los astrocitos constituyen la población celular más abundante del Sistema Nervioso Central (SNC). En condiciones normales proveen soporte físico y metabólico a las neuronas y están implicados en la generación y el procesamiento de la información neural (Murphy and Pearce, 1987; Martin,

1992; Bezzi and Volterra, 2001). 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, aumento en la proliferación y por el desarrollo de procesos gruesos y largos con un alto contenido de GFAP (proteína ácida fibrilar de la glía). 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 (Eddleston and Mucke, 1993; Ridet et al., 1997; Pekny and Nilsson, 2005).

En la ELA una pronunciada gliosis reactiva rodea 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 (Kushner et al., 1991; Nagy et al., 1994; Schiffer et al., 1996; Levine et al., 1999; Rowland and Shneider, 2001; Barbeito et al., 2004). Al ser la activación astrocitaria un rasgo común de varias condiciones patológicas como la isquemia cerebral (Norenberg, 1994), la enfermedad de Alzheimer (Beach et al., 1989; Pike et al., 1995), la enfermedad de Parkinson (Renkawek et al., 1999), la demencia frontotemporal (Green et al., 1997) y la enfermedad de Huntington (Hsiao and Chern, 2010), 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 patogénesis de enfermedades neurodegenerativas (Verkhatsky et al., 2012) e incluso han sido identificados como la causa primaria de la neuropatología asociada a la enfermedad de Alexander (Brenner et al., 2001).

Actualmente se acepta que la ELA no es una enfermedad de un único tipo celular (Clement et al., 2003) y se ha focalizado la investigación en las células que rodean a la motoneurona: 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; Lino et al., 2002), aunque la expresión de SOD1 mutada pan-neuronal sí es suficiente para que se desarrolle la enfermedad (Jaarsma et al., 2008). La expresión de SOD1 mutada en las motoneuronas tendría un rol disparador de la enfermedad, ya que una disminución específica en su expresión a nivel de motoneuronas es capaz de postergar el inicio pero no enlentecer el progreso de la patología (Miller et al., 2005; Ralph et al., 2005). 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 (Boillee et al., 2006; Yamanaka et al., 2008b). 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 (SOD1^{G93A}) resultan neurotóxicos para motoneuronas, lo cual podría reflejar el rol de los astrocitos en la progresión de la enfermedad (Vargas et al., 2006; Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007). De hecho, el reciente aislamiento de astrocitos con un fenotipo aberrante (llamados “células AbA”) a partir de cultivos primarios de médula espinal de ratas SOD1^{G93A} sintomáticas, caracterizados por una capacidad proliferativa y neurotóxica aún mayor que la de los astrocitos obtenidos de animales neonatales (Diaz-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 que los astrocitos podrían contribuir a la pérdida neuronal en esta enfermedad, ya sea liberando factor de crecimiento nervioso (NGF) el cual a través de su receptor p75 puede conducir a la muerte de motoneuronas (Cassina et al.,

2002; Pehar et al., 2004; Cassina et al., 2005), o aumentando la producción de óxido nítrico (Vargas et al., 2006), superóxido y peroxinitrito (Cassina et al., 2008). Nuestro grupo también ha presentado evidencias de que mejorando la capacidad antioxidante de los astrocitos es posible revertir la muerte de motoneuronas en cocultivos, ya sea utilizando inhibidores de la óxido nítrico sintasa (NOS) y secuestradores de superóxido y peroxinitrito (Cassina et al., 2005), o mediante la activación del factor de transcripción Nrf2 (Vargas et al., 2005). Nrf2 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 and Hirrlinger, 2003).

Alteraciones mitocondriales en la ELA

Muchos de los mecanismos patogénicos postulados para la ELA involucran a las mitocondrias, lo cual sugiere que alteraciones en la función mitocondrial pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad. Se han descrito alteraciones mitocondriales en la médula espinal y músculo de pacientes y modelos animales vinculados a mutaciones en la enzima SOD1 (Dupuis et al., 2004; Kawamata and Manfredi, 2010).

Las mitocondrias regulan gran número de vías metabólicas y de señalización y juegan también un rol importante en la muerte celular programada. La función principal de las mitocondrias es la producción de ATP a través del proceso de fosforilación oxidativa, el cual es llevado a cabo por los cuatro complejos de la cadena respiratoria (complejos I-IV) y la ATP sintasa (complejo V), todos localizados en la membrana mitocondrial interna (Figura 1). El flujo de electrones en la cadena respiratoria se asocia a la salida de protones (H^+), 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; de esta forma el $m\Delta\psi$ refleja la actividad de la cadena de transporte de electrones

(CTE) y la función mitocondrial. 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 y por lo tanto una de las principales fuentes de estrés oxidativo en las células (Radi et al., 2002; 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 et al., 2002).

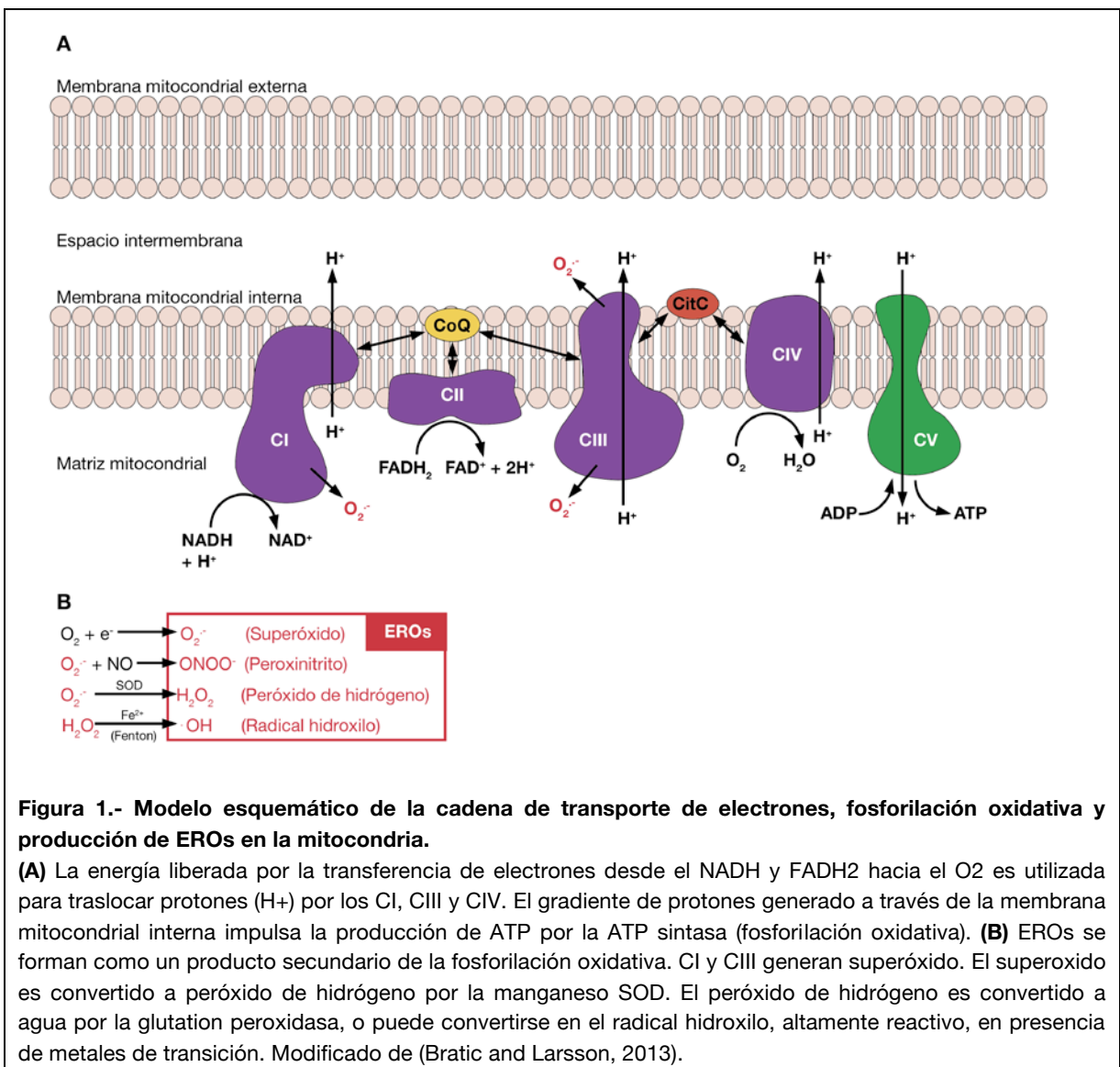


Figura 1.- Modelo esquemático de la cadena de transporte de electrones, fosforilación oxidativa y producción de EROs en la mitocondria.

(A) La energía liberada por la transferencia de electrones desde el NADH y FADH₂ hacia el O₂ es utilizada para traslocar protones (H⁺) por los CI, CIII y CIV. El gradiente de protones generado a través de la membrana mitocondrial interna impulsa la producción de ATP por la ATP sintasa (fosforilación oxidativa). **(B)** EROs se forman como un producto secundario de la fosforilación oxidativa. CI y CIII generan superóxido. El superóxido es convertido a peróxido de hidrógeno por la manganeso SOD. El peróxido de hidrógeno es convertido a agua por la glutatión peroxidasa, o puede convertirse en el radical hidroxilo, altamente reactivo, en presencia de metales de transición. Modificado de (Bratic and Larsson, 2013).

En las mitocondrias de pacientes con ELA se han detectado anomalías morfológicas, ultraestructurales y funcionales (Dupuis et al., 2004; Manfredi and Xu, 2005). Se han descrito mitocondrias anormales agregadas en el músculo estriado esquelético (Afifi et al., 1966), en las motoneuronas lumbares (Sasaki and Iwata, 1996) y en las terminales nerviosas motoras (Siklos et al., 1996). En ratones transgénicos portadores de la forma mutada de la SOD1 humana (SOD1^{G93A} o SOD1^{G37A}), aún antes de manifestar síntomas motores, se han encontrado mitocondrias vacuoladas en motoneuronas que carecen de otras características apoptóticas (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 SOD1^{G93A} se encuentra francamente disminuida (Jung et al., 2002; Mattiazzi et al., 2002). La SOD1 es una enzima antioxidante de amplia distribución en el organismo. Durante mucho tiempo se pensó que su localización era exclusivamente citosólica pero se ha mostrado que también se encuentra en el espacio intermembranoso mitocondrial (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001; Sturtz et al., 2001; Field et al., 2003). Las formas mutadas de la SOD1 que se asocian a la ELA también pueden encontrarse en las mitocondrias (Jaarsma et al., 2001; Higgins et al., 2002; Liu et al., 2004), tanto en el espacio intermembranoso como adheridas al lado citosólico o incluso en la matriz mitocondrial (Vijayvergiya et al., 2005). Además se ha sugerido que la SOD1^{G93A} puede alterar la asociación del citocromo c con la membrana mitocondrial interna facilitando la apoptosis (Vijayvergiya et al., 2005) o que puede agregarse luego de ser dañada por especies reactivas del oxígeno o del nitrógeno (Deng et al., 2006). Recientemente la expresión de la enzima mutada exclusivamente en la mitocondria demostró ser suficiente para la 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.

Disfunción mitocondrial 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 (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). La sobreexpresión de SOD1^{G93A} en una línea celular de motoneuronas reproduce la morfología y la respiración mitocondrial anormal al inhibir componentes específicos de la cadena de transporte mitocondrial (Menzies et al., 2002) y determinando una mayor muerte celular por inhibición de la glucólisis anaerobia. Esto sugiere que la expresión de la SOD1^{G93A} 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. Si las células dependen exclusivamente de la glucólisis para la producción de energía, la adopción de este fenotipo glucolítico genera productos (lactato y acidosis) que pueden dañar a las células vecinas. Tales observaciones adquieren relevancia para comprender el impacto de la expresión de la SOD1^{G93A} 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 (Almeida et al., 2001). La inhibición de la actividad mitocondrial en astrocitos no transgénicos 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. Por otra parte, los astrocitos que expresan la mutación SOD1^{G93A} presentan una actividad mitocondrial reducida, con menor capacidad de síntesis de ATP y producen mayores niveles de óxido nítrico, superóxido y peroxinitrito, detectándose daño nitrooxidativo en proteínas mitocondriales. Estas alteraciones en la función mitocondrial de los astrocitos están asociadas a cambios fenotípicos de tipo neurotóxico, los que reducen la supervivencia de motoneuronas en cocultivo (Cassina et al., 2008). Estos efectos pueden ser revertidos 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.

Terapéutica dirigida hacia las mitocondrias en la ELA

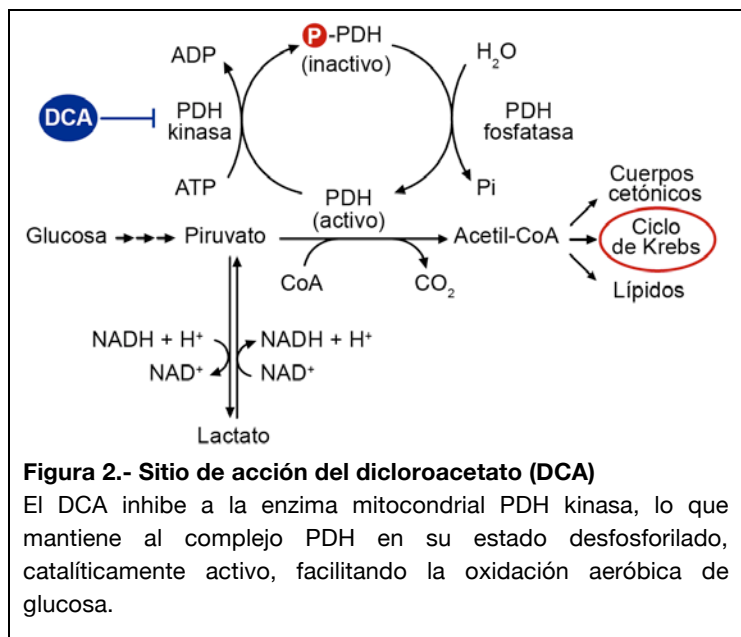
Hasta ahora sólo dos estrategias terapéuticas dirigidas hacia la mitocondria se han probado en modelos de ELA. En primer lugar, la alimentación de ratones SOD1^{G86R} con creatina, compuesto que previene la apertura del poro de transición mitocondrial, aumenta la supervivencia en un 20% (Klivenyi et al., 1999), sin embargo el ensayo clínico en pacientes resultó negativo (Shefner et al., 2004). La 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, fenómenos ambos que determinan apoptosis. Estos tratamientos retardan el comienzo de los síntomas y aumentan la supervivencia de ratones transgénicos para la ELA (Zhu et al., 2002; Kirkinezos et al., 2004). Sin embargo, ninguno de estos compuestos hasta ahora ha probado tener efecto en la ELA humana. 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 un modelo animal de ELA (Liu et al., 2002; Wu et al., 2003). Además, el tratamiento de los astrocitos SOD1^{G93A} con compuestos antioxidantes diseñados para acumularse preferencialmente en las mitocondrias (Mito-Q y Mito-CP) (Kelso et al., 2001; Dhanasekaran et al., 2005) restablece la función mitocondrial, reduce los marcadores de estrés oxidativo y restituye la actividad trófica para motoneuronas (Cassina et al., 2008). Sin embargo, ninguna de estas estrategias ha sido aplicada al tratamiento de la ELA humana.

Dicloroacetato

Teniendo en cuenta la disfunción mitocondrial observada en la ELA, una estrategia terapéutica alternativa podría ser la estimulación de la actividad mitocondrial a través de la facilitación del aporte de sustratos a la cadena

respiratoria. 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 (PDH), localizado en la matriz mitocondrial, que media la formación de acetil-coenzima A 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 PDH kinasa (PDK). El organohaluro dicloroacetato (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., 1988; Stacpoole et al., 2006). El DCA es un inhibidor de PDK 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 CO₂ en la mitocondria (Figura 2), estimulando 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 E1α del complejo. Se ha planteado que cambios en la fosforilación de la subunidad E1α 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). Los astrocitos SOD1^{G93A}



comparten con las células tumorales la disfunción mitocondrial y una proliferación aumentada (Gandelman et al., 2010), por lo tanto sería de interés analizar si el DCA podría revertir el efecto neurotóxico en astrocitos.

En el sistema nervioso central, el DCA estimula la oxidación de glucosa y lactato a CO₂ y reduce la liberación de lactato principalmente en astrocitos, porque son las células que habitualmente realizan glucólisis anaerobia. Por el contrario casi no tendría efectos sobre las neuronas debido a la compartimentación del metabolismo de la glucosa entre neuronas y astrocitos (Itoh, 2003). 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 puede ser modulado por el DCA (Itoh, 2003). 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. De hecho, el DCA es utilizado actualmente en la clínica para disminuir niveles elevados de lactato en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedades mitocondriales (Stacpoole, 1989; Stacpoole et al., 2006). Sin embargo, se desconoce si el DCA podría resultar beneficioso en el tratamiento de desórdenes neurológicos asociados a disfunción mitocondrial y, específicamente, si podría prevenir la influencia neurotóxica *in vivo* e *in vitro* de los astrocitos SOD1^{G93A}.

Hipótesis y Objetivos

La actividad mitocondrial de los astrocitos influye en la supervivencia de las neuronas circundantes y la alteración de la actividad mitocondrial de los astrocitos determina cambios fenotípicos que conducen a la disminución de su capacidad trófica. Por lo tanto, nuestra hipótesis predice que el restablecimiento de la función mitocondrial de los astrocitos en un modelo de ELA por el tratamiento con DCA podría revertir su fenotipo neurotóxico. Asimismo, la administración de DCA a ratones ELA como mecanismo para estimular la actividad mitocondrial astrocítica *in vivo* podría disminuir o retrasar el daño neuronal en la médula espinal de estos animales y conducir a un retraso en el inicio de los síntomas motores o a un enlentecimiento del desarrollo de los mismos.

Objetivo general:

Investigar el efecto de la estimulación de la respiración mitocondrial por el DCA sobre la neurotoxicidad glial y el desarrollo de síntomas en un modelo de ELA.

Objetivos específicos:

- 1) Investigar el efecto del DCA sobre la actividad mitocondrial y el fenotipo neurotóxico *in vitro* de astrocitos SOD1^{G93A}.
- 2) Analizar la repercusión del tratamiento con DCA sobre la progresión de la patología a nivel tisular en un modelo animal de ELA.
- 3) Evaluar los efectos del DCA sobre la funcionalidad motora y la supervivencia alcanzada por los animales.

Estrategia de investigación

Para alcanzar el primer objetivo, cultivos primarios de astrocitos espinales no transgénicos y SOD1^{G93A} fueron tratados con DCA, luego de lo cual se evaluó el efecto del tratamiento con DCA sobre su actividad mitocondrial, midiendo el consumo de oxígeno y el acoplamiento mitocondrial mediante respirometría de alta resolución. Para evaluar los efectos del DCA sobre la actividad trófica de los astrocitos hacia motoneuronas se establecieron cocultivos mediante el sembrado de motoneuronas sobre monocapas de astrocitos no transgénicos y SOD1^{G93A} pre-tratados con DCA, evaluándose la supervivencia neuronal como indicador del fenotipo astrocitario.

Para el abordaje del segundo objetivo, grupos de ratones SOD1^{G93A} fueron tratados con DCA o vehículo y se estudiaron los efectos del tratamiento en la función mitocondrial tisular de la médula espinal midiendo el consumo de oxígeno por oximetría y estimando el nivel de acople mitocondrial. Otros grupos de ratones fueron fijados por perfusión y se realizaron cortes histológicos para cuantificar el número de motoneuronas en la médula espinal lumbar utilizando la técnica de Nissl y la reactividad glial mediante inmunofluorescencia contra GFAP.

Para alcanzar el tercer objetivo, ratones SOD1^{G93A} tratados con DCA o vehículo fueron observados cada 48 horas para registrar su peso, realizar pruebas funcionales para evaluar su desempeño motor y registrar el inicio de síntomas y la supervivencia alcanzada por los animales.

Materiales y métodos

Materiales

Los medios de cultivo y el suero fueron obtenidos de Gibco (Invitrogen). El material plástico de Nunc y Corning. El resto de los reactivos son de Sigma-Aldrich a no ser que se especifique lo contrario.

Protocolos de experimentación animal

Los protocolos de experimentación utilizados para el mantenimiento de las colonias de roedores y para el sacrificio de ratas adultas (para el cultivo de motoneuronas) y de neonatos (para el cultivo de astrocitos) fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República (protocolo experimental número 071140-001564-08).

Animales

Los ratones que sobreexpresan la enzima SOD1 humana con la mutación G93A, cepa B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J (Gurney et al., 1994) fueron comprados a Jackson Laboratories. Las ratas que expresan la misma mutación, cepa Sprague-Dawley NTac:SD-TgN(SOD1G93A)L26H (Howland et al., 2002)) fueron obtenidas de Taconic. Todos los animales fueron mantenidos en la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE; Facultad de Medicina, Universidad de la República) con acceso libre a comida y agua. El transgen se mantuvo en hemicigosis mediante cruzamiento de machos transgénicos y hembras no transgénicas. Las camadas fueron luego genotipadas mediante PCR utilizando cebadores contra SOD1 humana a partir de ADN aislado de biopsias de cola de los animales como fue descrito previamente (Vargas, 2005). La figura 3 muestra una imagen representativa del resultado de PCR del genotipado de los animales.

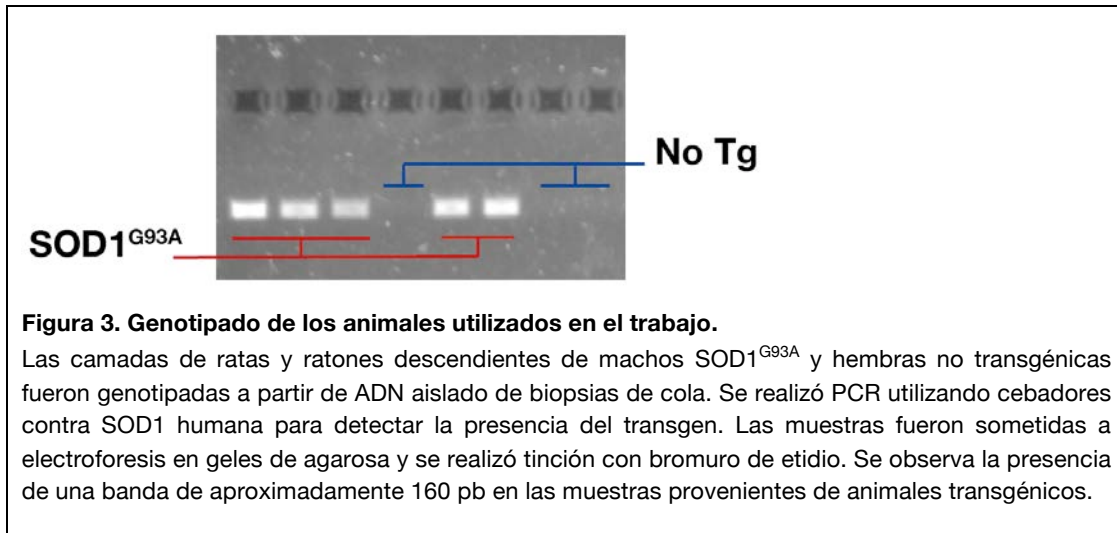


Figura 3. Genotipado de los animales utilizados en el trabajo.

Las camadas de ratas y ratones descendientes de machos SOD1^{G93A} y hembras no transgénicas fueron genotipadas a partir de ADN aislado de biopsias de cola. Se realizó PCR utilizando cebadores contra SOD1 humana para detectar la presencia del transgen. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa y se realizó tinción con bromuro de etidio. Se observa la presencia de una banda de aproximadamente 160 pb en las muestras provenientes de animales transgénicos.

Cultivos celulares

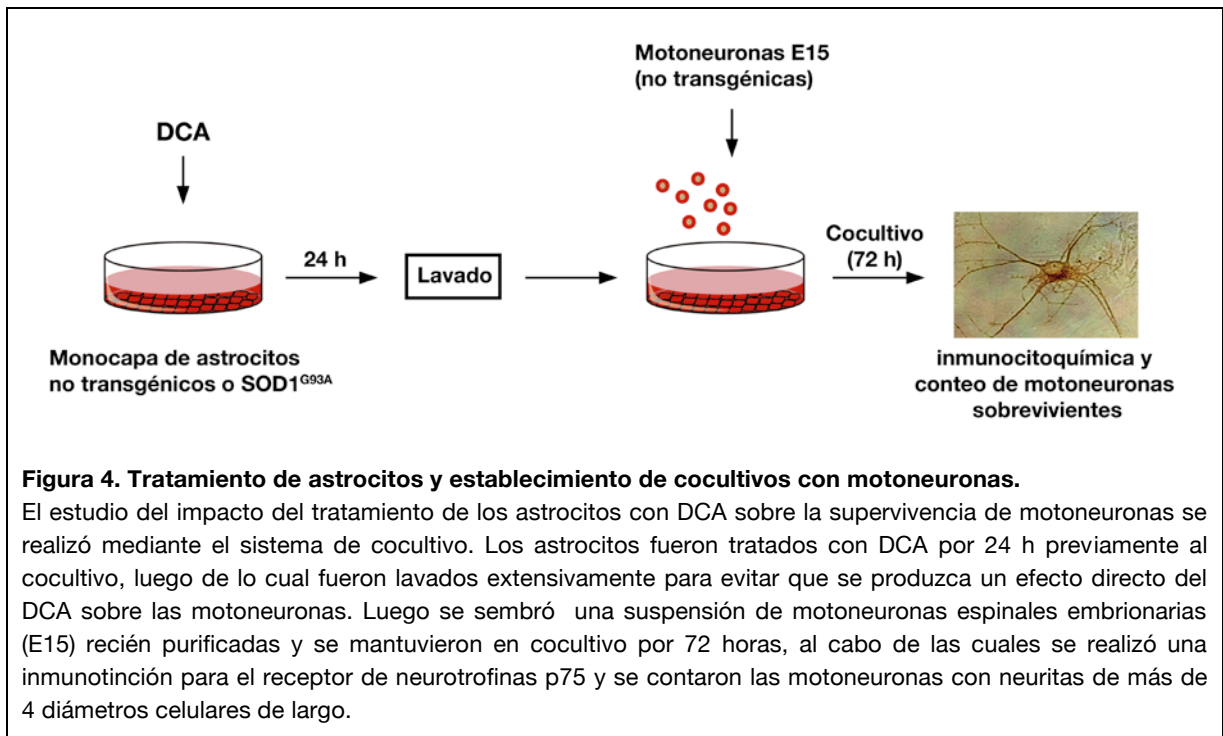
Cultivos de astrocitos espinales: Los cultivos primarios altamente enriquecidos en astrocitos espinales se realizaron a partir de ratas neonatas (P1-P2) no transgénicas y SOD1^{G93A} como fue descrito previamente (Cassina et al., 2002; Vargas et al., 2006). Brevemente, se extrajo la columna vertebral de los neonatos y se aisló la médula espinal, removiendo cuidadosamente las meninges. El tejido fue cortado en fragmentos que se incubaron con tripsina al 0,25% en PBS (Na₂HPO₄ 0,92 g/L; KH₂PO₄ 0,2 g/L; NaCl 8,0 g/L; KCl 0,2 g/L) a 37°C. Luego de 25 minutos la digestión se detuvo agregando DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con penicilina (100 U/L), estreptomycin (100 µg/mL), HEPES (15 mM) y 10% de suero fetal bovino (SFB). Se adicionó ADNasa (50 µg/mL) y se disgregó mecánicamente utilizando una micropipeta de 1000 µL. La suspensión celular obtenida se plaqueó a una densidad de 1,5x10⁶ células por botella de cultivo de 25cm². Luego de una semana los astrocitos forman una monocapa confluyente, de la cual se remueven los otros tipos celulares mediante su agitación (250 rpm, 48 horas) y posteriormente su incubación con citosina arabinósido (10 µM, 48 horas). Los cultivos purificados de astrocitos se amplificaron mediante su tripsinización y plaqueo a menor densidad ya sea nuevamente en botellas de cultivo de 25 cm², en placas de Petri de 35 mm o en placas de 24 pocillos (a una densidad de 2 x 10⁴ células/cm²). Los cultivos se mantuvieron en DMEM

suplementado con 10% SFB. Al cabo de una semana los astrocitos forman monocapas confluentes y se encuentran listos para ser tratados.

Cocultivos de astrocitos y 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 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) y suero de caballo (2%) suplementado con 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 inmunoafinidad empleando un anticuerpo monoclonal contra el receptor de neurotrofinas p-75 (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/cm² sobre monocapas de astrocitos confluentes en medio L15 completo.

Tratamiento de los cultivos y conteo de motoneuronas

Las solución de DCA para el tratamiento de cultivos celulares se preparó en agua destilada y se aplicó a las monocapas de astrocitos a las concentraciones indicadas en el medio de cultivo (DMEM + 10% SFB). Para los experimentos de cocultivo, las monocapas de astrocitos fueron tratadas con DCA por 24 h, luego de lo cual se realizaron 2 lavados con PBS para remover el tratamiento y se plaquearon las motoneuronas en medio L15 suplementado. Posteriormente se evaluó la supervivencia de motoneuronas luego de 72 h en cocultivo como fue descrito previamente (Cassina et al., 2002). Para poder visualizar las motoneuronas sobre la monocapa astrocitaria, los cocultivos fueron sometidos a inmunohistoquímica para p75 (receptor de neurotrofinas expresado fuertemente por las motoneuronas en este estadio del desarrollo y débilmente por los astrocitos). Para esto fueron incubados por 20 minutos a 37° C con sobrenadante del hibridoma IgG192 (1:2 en el medio de cultivo preexistente). Luego fueron lavados 1 vez con PBS y fijados con paraformaldehído (PFA) 4% y glutaraldehído 0,1% en PBS durante 15 minutos sobre hielo. Posteriormente fueron incubados por 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (BSA 2%; Tritón X-100 0,1% en PBS). Luego se incubaron toda la noche a 4°C con el sobrenadante de hibridoma IgG192 diluido 2:3 en solución de bloqueo. Luego de lavar con PBS los cultivos fueron incubados por 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo contra IgG de ratón biotilado (1:125) en solución de bloqueo y posteriormente con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (1:175 en Tris-HCl 0,1 M pH 7,4) por 1 hora a temperatura ambiente. 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 células inmunorreactivas para p75 que presentaban por lo menos una neurita de una longitud superior a 4 diámetros del cuerpo celular. En la figura 4 se detalla el esquema de tratamiento y establecimiento de cocultivos.

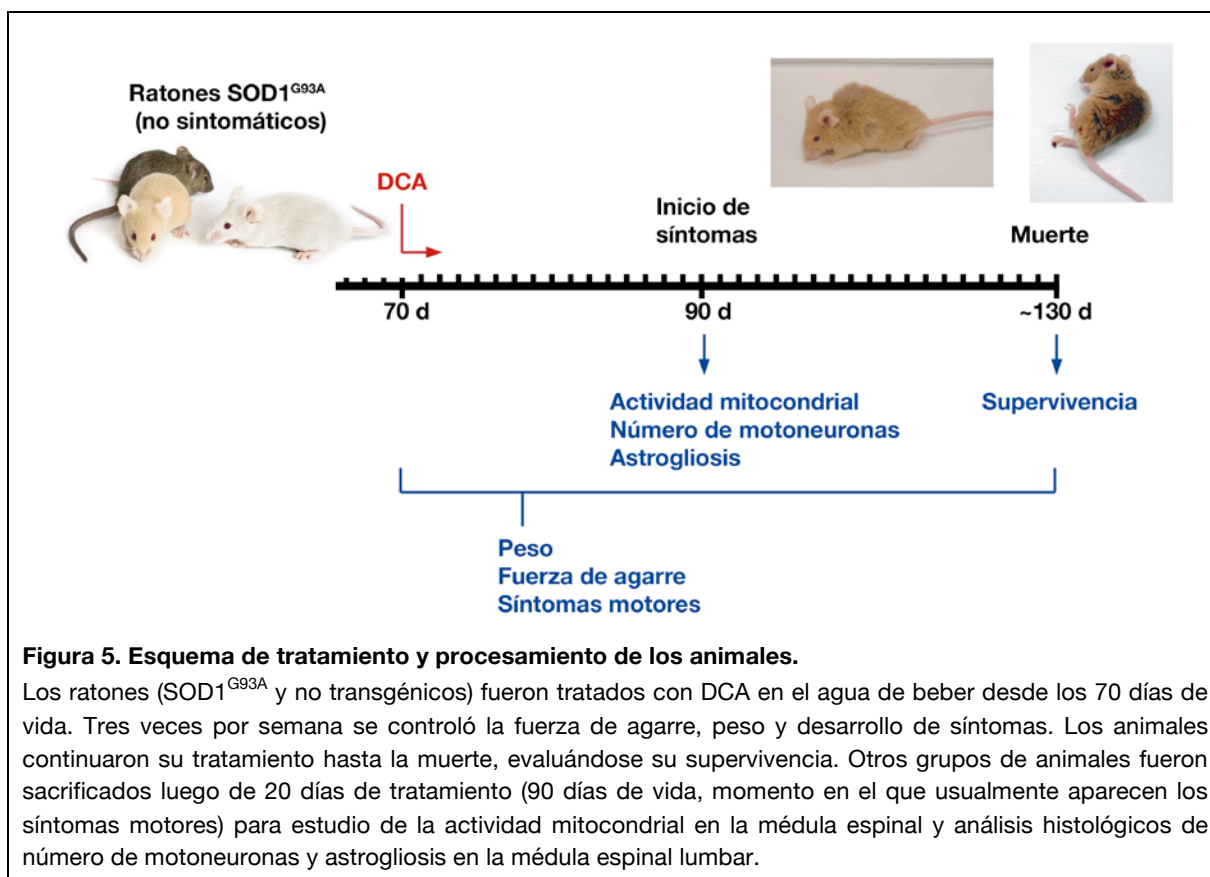


Tratamiento de los ratones con dicloroacetato

Ratones $SOD1^{G93A}$ machos y hembras y sus compañeros de camada no transgénicos fueron divididos aleatoriamente en los siguientes grupos (n=9 por grupo): A) grupo control transgénico y B) control no transgénico, que recibieron agua de beber ordinaria; C) grupo transgénico tratado con DCA y D) no transgénico tratado con DCA, a los que se les administró DCA en el agua de beber a una concentración de 500 mg/L. Se calculó una dosis diaria de 100 mg/kg en base a una ingesta diaria de 5 mL (Bachmanov et al., 2002). Se preparó una solución fresca de DCA dos veces por semana y se controló el volumen total consumido para asegurar una dosis constante, comprobando también que no hubiera diferencias en la ingesta de agua entre el grupo control y el tratado con DCA.

El tratamiento de los ratones se realizó desde la etapa presintomática (70 días de edad) hasta la muerte. Se observó a los animales 3 veces por semana para controlar el peso, ingesta de agua, inicio de los síntomas y la progresión de la enfermedad. 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. En la figura 5 se detalla el esquema de tratamiento y procesamiento de los animales.



Análisis histológico e inmunofluorescencia

Ratones SOD1^{G93A} y no transgénicos (n=3 por grupo) fueron tratados con DCA como fue descrito, desde los 70 días de vida. 20 días después los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg, intraperitoneal) y perfundidos transcárdicamente con paraformaldehído al 4% en PBS. Se disecaron sus médulas espinales, las que fueron posfijadas e incluidas en paraplast. Se realizaron cortes seriados de 5 µm de espesor utilizando un micrótopo, los que luego fueron teñidos con azul de toluidina o procesados para inmunofluorescencia. Para la inmunodetección de GFAP, los cortes fueron permeabilizados utilizando Tritón X-100 al 0,2 % en PBS y se bloquearon uniones inespecíficas (10% suero de cabra, 2% BSA, 0,2 % Tritón

X-100 en PBS). Luego se incubaron los cortes con un anticuerpo monoclonal de ratón contra GFAP conjugado con Cy-3 (1:600) durante toda la noche a 4° C y se montaron los cortes con glicerol. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81.

Conteo de motoneuronas y medida de astrogliosis en la médula espinal

Se cuantificó el número de motoneuronas en la médula espinal lumbar contando en cortes de 5 µm de espesor teñidos con azul de toluidina el número de células en la lámina IX de Rexed que presenten morfología neuronal, correspondientes a motoneuronas, con núcleo y nucléolo en el plano de corte. Se analizó un corte cada 20 µm y por lo menos 25 cortes por animal.

La astrogliosis se cuantificó a partir de imágenes obtenidas de uno de cada cinco cortes de médula espinal lumbar procesados con inmunofluorescencia contra GFAP (20 cortes por grupo). Se utilizó el software ImageJ (NIH) para medir en cada corte el área inmunorreactiva para GFAP en el asta ventral, expresándose como porcentaje del área total en un campo circular de diámetro constante contenido en la zona anterior del asta ventral.

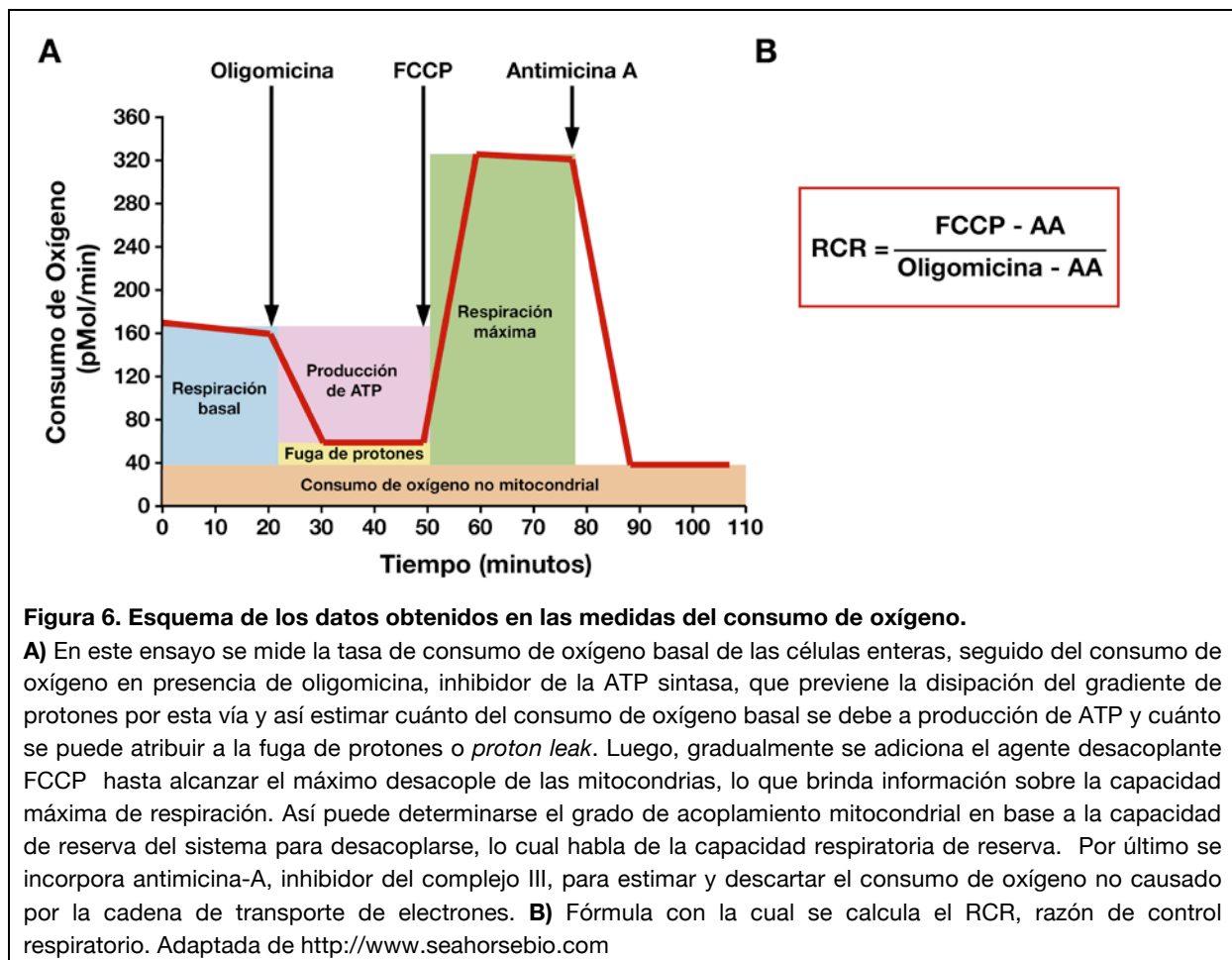
Consumo de oxígeno

Los estudios de consumo de oxígeno se realizaron en colaboración con la Dra. Adriana Cassina, del Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Se utilizó un oxímetro Oxygraph 2K (Oroboros Instruments Corp.). La respiración fue evaluada en células intactas (astrocitos) o trozos de médula espinal de ratones a 37°C. Se calculó la tasa de consumo de oxígeno mediante el software del equipo (DatLab), expresándose como pmol de O₂ · s⁻¹ · ml⁻¹.

Para la respiración celular, las monocapas de astrocitos fueron tratadas con DCA (5 mM) o vehículo por 24 h. Luego se levantaron las células por raspado y se resuspendieron en medio de cultivo a una concentración de 2x10⁶ células/ml. La suspensión celular se introdujo en la cámara del aparato, donde se evaluó el consumo de oxígeno mitocondrial de las células intactas en su estado basal, luego de la adición de oligomicina 2 µg/ml, luego de pasos

sucesivos de adición del agente desacoplante FCCP (carbonil cianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona) 0,5 μ M hasta alcanzar el máximo de desacoplamiento donde se observa la respiración máxima y culminando con la incorporación de antimicina-A 2,5 μ M como fue descrito previamente (Gnaiger, 2007). En la figura 6 se esquematiza la información obtenida en cada paso del ensayo. Se calculó el consumo de oxígeno mitocondrial y el RCR (razón de control respiratorio) como: $RCR = \frac{\text{flujo máximo desacoplado (FCCP)} - \text{flujo inhibido con antimicina-A}}{\text{flujo inhibido con oligomicina} - \text{flujo inhibido con antimicina-A}}$.

Para la respiración de la médula espinal, se trataron ratones de 70 días de edad con DCA o vehículo por 20 días (n=3 por grupo), luego de lo cual se sacrificaron los animales y se disecó su médula espinal. Las médulas espinales fueron lavadas inmediatamente en medio de respiración (sacarosa 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) e introducidas (10-15 mg) en el oxígrafo Oroboros para realizar respirometría de alta resolución. El consumo mitocondrial de oxígeno se midió del mismo modo que el indicado para los estudios celulares, normalizando los valores obtenidos por mg de tejido.

Pruebas funcionales

La función motora de los ratones fue evaluada mediante dos tipos de pruebas funcionales. Por un lado, tres veces por semana se realizó la prueba de la rejilla invertida. En ésta, los animales son dispuestos sobre una rejilla metálica, la cual es invertida, quedando los animales colgados por sus patas. A continuación se mide el tiempo que demoran los ratones en soltarse y caer de la rejilla, estableciéndose un tiempo máximo de 60 segundos para cada ratón. Por otro lado se midió la fuerza de los miembros posteriores utilizando un medidor de fuerza de agarre (*Grip Strength Meter*, San Diego Instruments). Esta prueba se realizó permitiendo a los animales agarrar una rejilla con sus miembros posteriores y posteriormente tirando de los animales hasta que soltaran la rejilla, registrando la fuerza máxima hasta el momento. Se registró la fuerza de agarre promedio de cinco pruebas consecutivas para cada animal, dos veces por semana, desde la sexta semana de vida hasta la muerte.

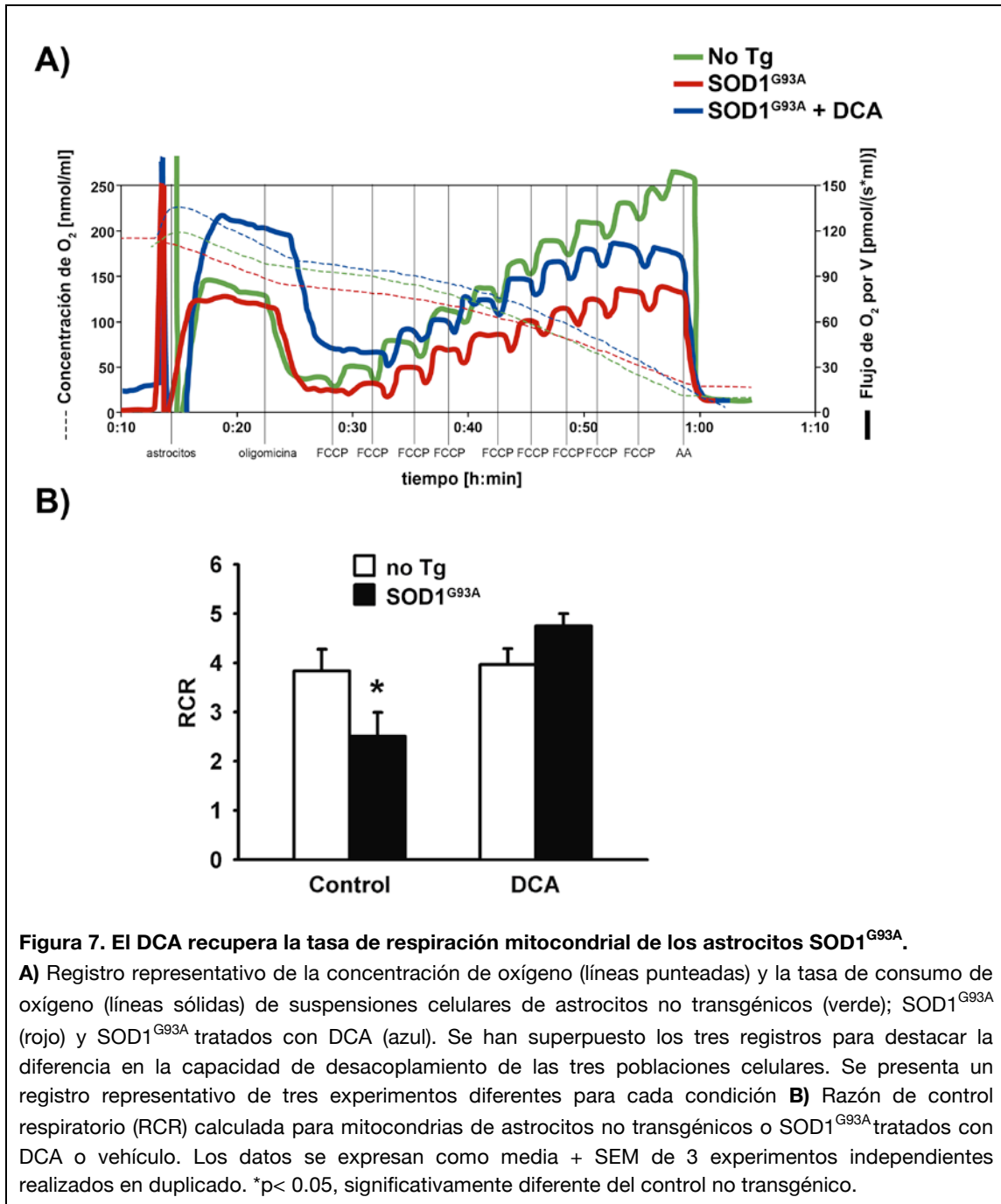
Estadística

Las curvas de supervivencia fueron comparadas mediante análisis de Kaplan-Meier con el test Log-rank utilizando el software Sigmaplot 12 (Systat software). Todos los ensayos de cultivo se realizaron por duplicado y se repitieron independientemente 3 veces como mínimo. Los datos cuantitativos fueron expresados como medias \pm error estándar de la media (SEM) y se realizaron análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de Student-Newman-Keuls o test t de Student según el caso para los análisis estadísticos, considerando significativas las diferencias cuando $p < 0,05$. En el caso en que los datos no presentaron distribución normal, se compararon las medias utilizando ANOVA de una vía en rangos con el test de Kruskal-Wallis. Todos los estudios estadísticos se realizaron utilizando el software Sigmaplot 12 (Systat Software) o Graphpad Prism.

Resultados

El tratamiento con DCA recupera la actividad mitocondrial de los astrocitos SOD1^{G93A}

El primer paso en la caracterización de los efectos del DCA sobre los astrocitos fue la determinación de su capacidad de estimular la actividad mitocondrial. Para evaluar el efecto del DCA sobre la tasa de respiración y el acoplamiento mitocondrial de los astrocitos, se trataron astrocitos SOD1^{G93A} y no transgénicos con DCA (5 mM, 24 h) y luego las células se sometieron a estudios de respirometría de alta resolución. En este ensayo se mide el consumo de oxígeno basal, en presencia de oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa, lo que previene la disipación del gradiente de protones por esta vía y así estimar la fuga de protones o *proton leak*) y luego de la adición del agente desacoplante FCCP (gradualmente hasta el máximo desacople), así determinando el grado de acoplamiento mitocondrial en base a la capacidad de reserva del sistema para desacoplarse. Por último se incorpora antimicina-A, inhibidor del complejo III, para estimar y descartar el consumo de oxígeno no causado por la cadena de transporte de electrones. La relación entre estos distintos flujos de oxígeno se expresa con el índice RCR (razón de control respiratorio), como fue detallado en materiales y métodos. El valor de RCR calculado para los astrocitos SOD1^{G93A} no tratados fue significativamente menor (45%) que el de los astrocitos no transgénicos, como fue descrito previamente (Cassina et al., 2008). El tratamiento con DCA mejoró el acoplamiento mitocondrial en los astrocitos SOD1^{G93A}. Los astrocitos SOD1^{G93A} tratados con DCA mostraron un aumento significativo del RCR a niveles similares a los de los astrocitos no transgénicos (Figura 7). Estos experimentos fueron realizados en colaboración con la Dra. Adriana Cassina, del Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República.



Estos efectos del DCA sobre la actividad mitocondrial de astrocitos fueron consecuencia de su ya conocido efecto inhibitorio sobre el nivel de fosforilación de PDH, lo cual fue comprobado mediante western blot cuantificando los niveles de PDH total y fosforilada ((Miquel et al., 2012); datos obtenidos con la colaboración de Emiliano Trías, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable).

El DCA previene la toxicidad de los astrocitos SOD1^{G93A} hacia motoneuronas

Los astrocitos SOD1^{G93A} presentan una influencia neurotóxica para motoneuronas, induciendo su muerte en condiciones de cocultivo. Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que dicho efecto neurotóxico puede revertirse con antioxidantes dirigidos a la mitocondria (Cassina et al., 2008), lo que podría indicar que alteraciones en la función mitocondrial jugarían un papel importante en la generación del fenotipo neurotóxico. Luego de comprobar el restablecimiento de la actividad mitocondrial de los astrocitos SOD1^{G93A} con DCA, decidimos determinar si la restauración de la función mitocondrial con DCA podría también aumentar la supervivencia neuronal sobre esos astrocitos en cocultivo. Para ello, sembramos motoneuronas no transgénicas purificadas sobre monocapas de astrocitos no transgénicos y SOD1^{G93A} pre-tratadas con DCA (5 mM, 24h) o vehículo. Como ha sido reportado previamente, la supervivencia de motoneuronas luego de 72 horas en cocultivo con astrocitos SOD1^{G93A} fue 40% menor a la observada sobre los astrocitos no transgénicos. Sin embargo, el tratamiento con DCA aumentó en forma significativa la supervivencia de motoneuronas sobre los astrocitos SOD1^{G93A} hasta niveles similares a los de los astrocitos no transgénicos (Figura 8).

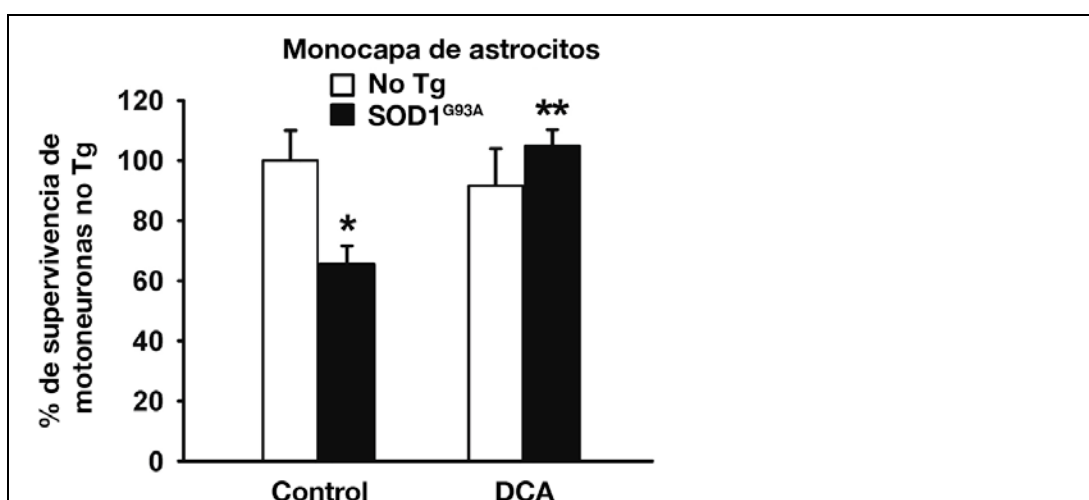


Figura 8. El DCA previene la neurotoxicidad de los astrocitos SOD1^{G93A} hacia motoneuronas. Supervivencia de motoneuronas 72 h luego de ser plaqueadas sobre astrocitos no transgénicos SOD1^{G93A} pretratados con DCA o vehículo. Los datos se expresan como porcentaje del control no transgénico, media + SEM de cuatro experimentos independientes. *p < 0.05, significativamente diferente del control no transgénico. **p < 0.05, significativamente diferente del control SOD1^{G93A}.

El DCA mejora la función mitocondrial en la médula espinal de los ratones SOD1^{G93A}

Habiendo determinado los efectos del DCA sobre los astrocitos *in vitro*, tanto en relación a su actividad mitocondrial como a su capacidad trófica para motoneuronas, analizamos si el DCA podría modular la progresión de los síntomas en un modelo animal de ELA, los ratones SOD1^{G93A}. Para evaluar si el DCA era capaz de mejorar la función mitocondrial *in vivo* se trataron ratones no transgénicos y SOD1^{G93A} con DCA o vehículo por 20 días (desde los 70 días de vida), luego de lo cual se aislaron sus médulas espinales lumbares, las que fueron sometidas a respirometría de alta resolución. El RCR calculado para las médulas espinales de ratones SOD1^{G93A} no tratados resultó significativamente inferior a la de sus compañeros de camada no transgénicos, en concordancia con reportes previos (Mattiuzzi et al., 2002). Por otro lado, los ratones SOD1^{G93A} tratados con DCA mostraron un aumento significativo en el RCR en comparación con el grupo no tratado (Figura 9).

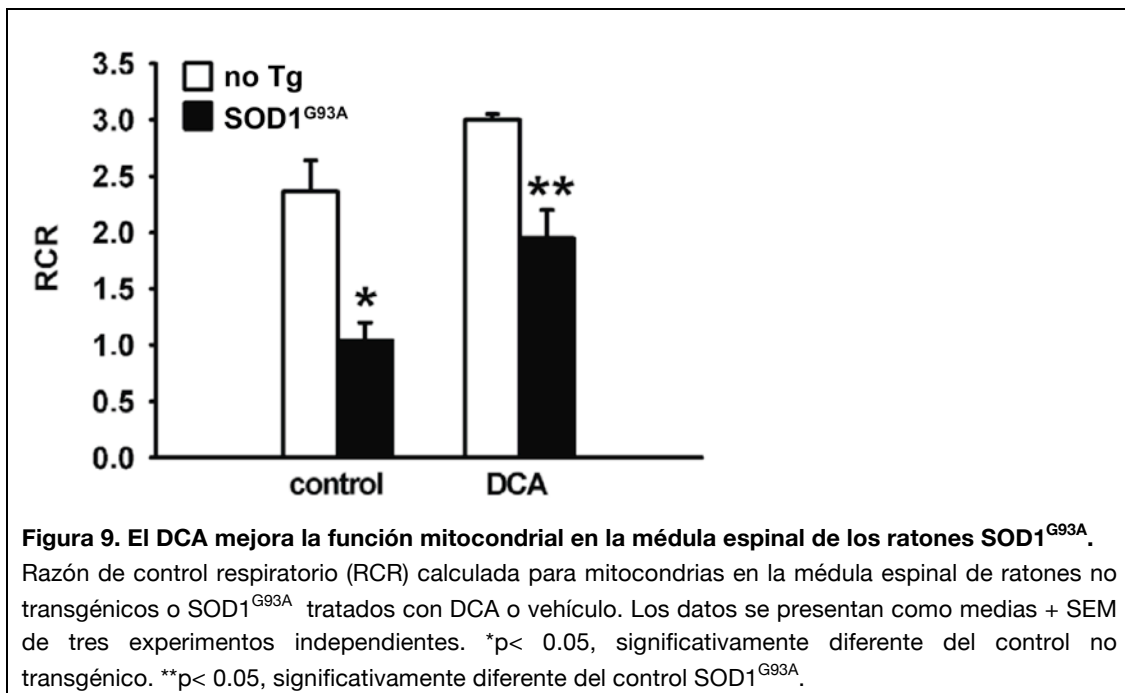


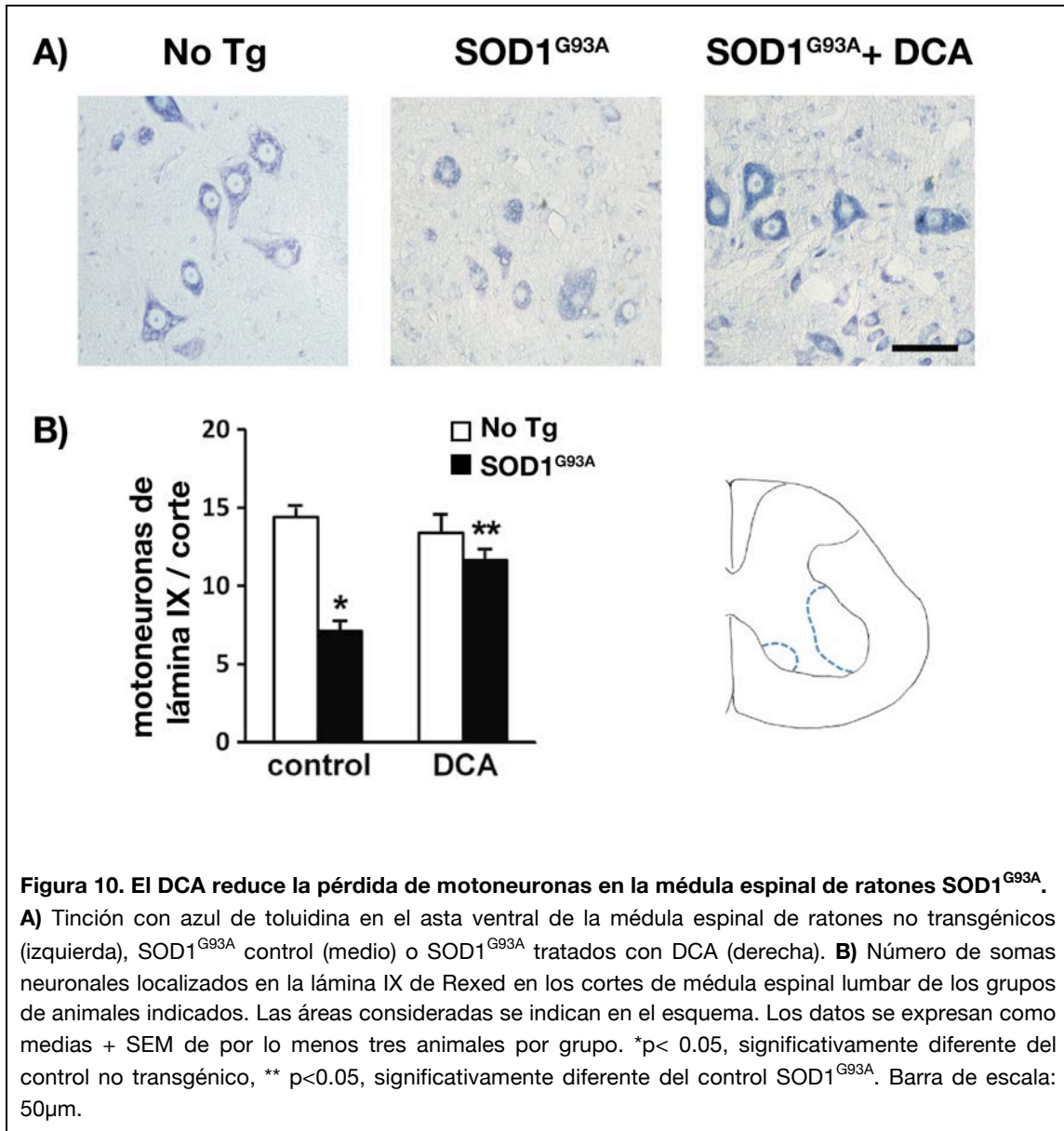
Figura 9. El DCA mejora la función mitocondrial en la médula espinal de los ratones SOD1^{G93A}.

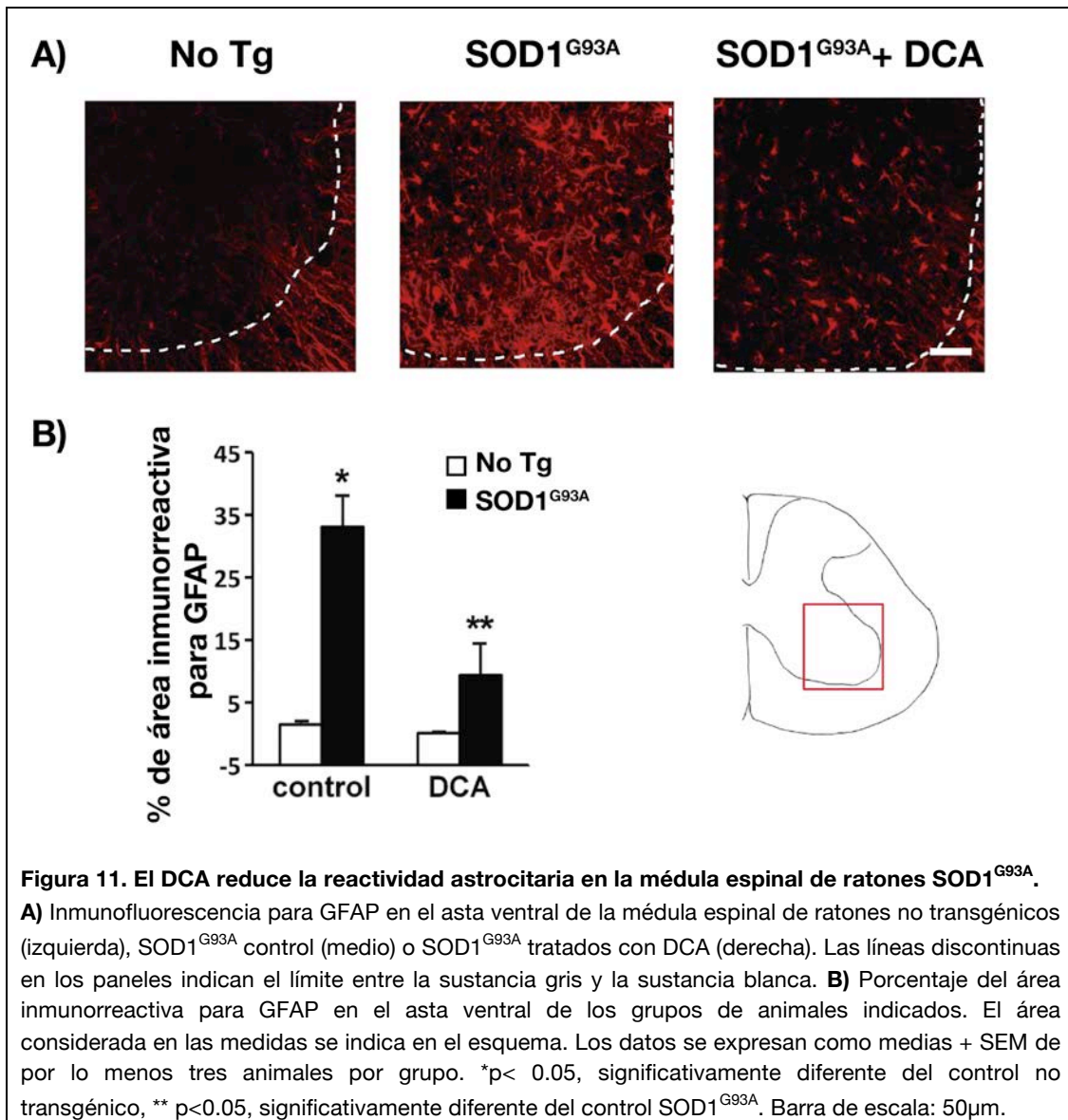
Razón de control respiratorio (RCR) calculada para mitocondrias en la médula espinal de ratones no transgénicos o SOD1^{G93A} tratados con DCA o vehículo. Los datos se presentan como medias + SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, significativamente diferente del control no transgénico. ** $p < 0.05$, significativamente diferente del control SOD1^{G93A}.

El tratamiento con DCA reduce la pérdida de motoneuronas y la reactividad astrocitaria en la médula espinal de los ratones SOD1^{G93A}

Para evaluar el efecto del DCA sobre la patología en la médula espinal de los ratones SOD1^{G93A}, determinamos los efectos del tratamiento sobre la población neuronal y glial de la médula espinal. En primer lugar, buscamos determinar el efecto de la administración de DCA sobre la pérdida de motoneuronas en la médula espinal de los ratones SOD1^{G93A}. Para ello, se trataron ratones no transgénicos y SOD1^{G93A} con DCA o vehículo por 20 días (desde los 70 días de edad), luego de lo cual los animales se sacrificaron y se procesó su médula espinal para estudios histológicos. Se realizó un conteo de somas neuronales a nivel de la lámina IX de Rexed, correspondientes a motoneuronas, en los segmentos espinales lumbares, evidenciándose la ya descrita pérdida de motoneuronas en los ratones SOD1^{G93A} en comparación con los animales no transgénicos (Figura 10). Sin embargo, el grupo de animales SOD1^{G93A} tratados con DCA presentó un número de somas neuronales significativamente mayor que los SOD1^{G93A} tratados con agua. Estos resultados indican que se redujo la pérdida de motoneuronas en los ratones SOD1^{G93A}, lográndose rescatar el 25% de las motoneuronas a nivel lumbar.

Por otro lado, estudiamos la inmunorreactividad para GFAP en la médula espinal. Como ha sido reportado previamente, la reactividad astrocitaria determinada por inmunofluorescencia contra GFAP aumenta progresivamente en la médula espinal de los ratones SOD1^{G93A} a medida que se agravan los síntomas motores (Levine et al., 1999; Barbeito et al., 2010). El tratamiento con DCA indujo una marcada reducción (70%) en la inmunorreactividad para GFAP en la médula espinal en comparación con el grupo no tratado (Figura 11).





El tratamiento con DCA aumenta la supervivencia de ratones SOD1^{G93A}

Luego de determinar que el DCA estimuló la actividad mitocondrial en la médula espinal y sus efectos sobre la población neuronal y glial, pasamos a evaluar si dicho tratamiento podría tener efectos protectores sobre la parálisis progresiva y eventual muerte de los ratones SOD1^{G93A}. Para esto, el compuesto fue administrado desde los 70 días de vida hasta la muerte en el agua de beber (500 mg/L). Seleccionamos esta dosis porque ha demostrado ser efectiva en ratones modelo de otra enfermedad neurodegenerativa, la enfermedad de Huntington (Andreassen et al., 2001). El DCA fue bien tolerado

y los animales no mostraron evidencia alguna de intoxicación, como pérdida de peso, enfermedad o muerte prematura en comparación con los ratones SOD1^{G93A} no tratados y los controles no transgénicos.

Existe una diferencia en el desempeño motor y en la supervivencia en estos ratones dependiendo del sexo que ha sido previamente descrita (Veldink et al., 2003; Heiman-Patterson et al., 2005) por lo cual todos los estudios se realizaron en machos y hembras por separado de acuerdo a lo recomendado en las guías para el uso de este modelo (Ludolph et al., 2010).

En primer lugar, se evaluó el efecto del tratamiento sobre la supervivencia media de los ratones SOD1^{G93A}. El tratamiento con DCA aumentó significativamente la supervivencia tanto en los machos como en hembras en comparación con los ratones control tratados únicamente con agua (machos control n=9: 126,9 ± 2,6 días, DCA n=9: 138,0 ± 2,8 días; hembras control n=10: 130,0 ± 1,87 días, DCA n=9: 138,4 ± 2,42 días; Figura 12).

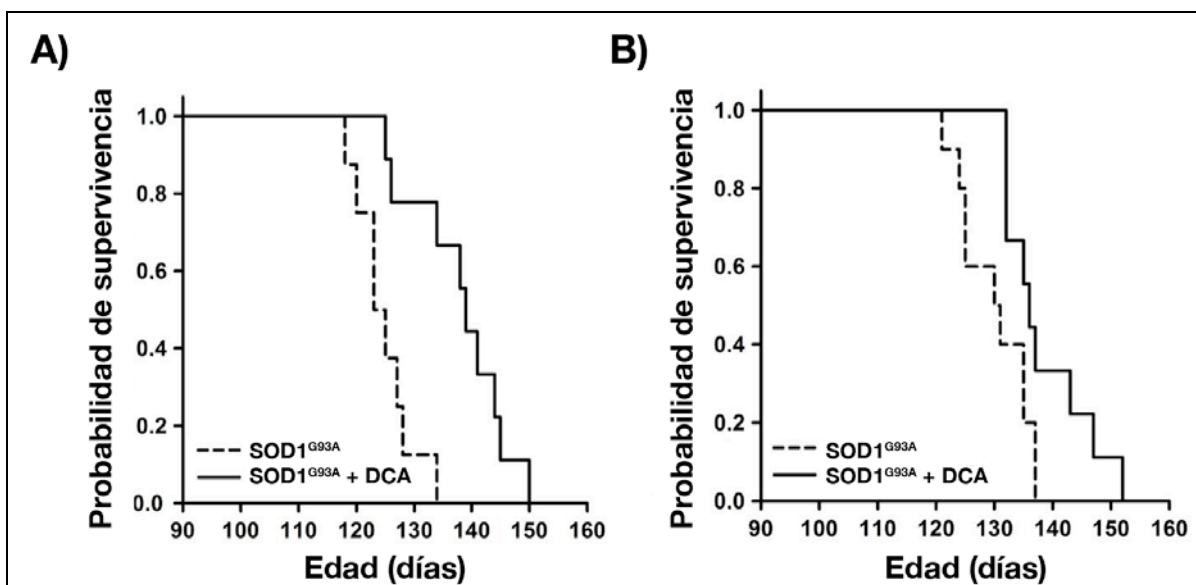


Figura 12. El DCA aumenta la supervivencia de ratones SOD1^{G93A}.

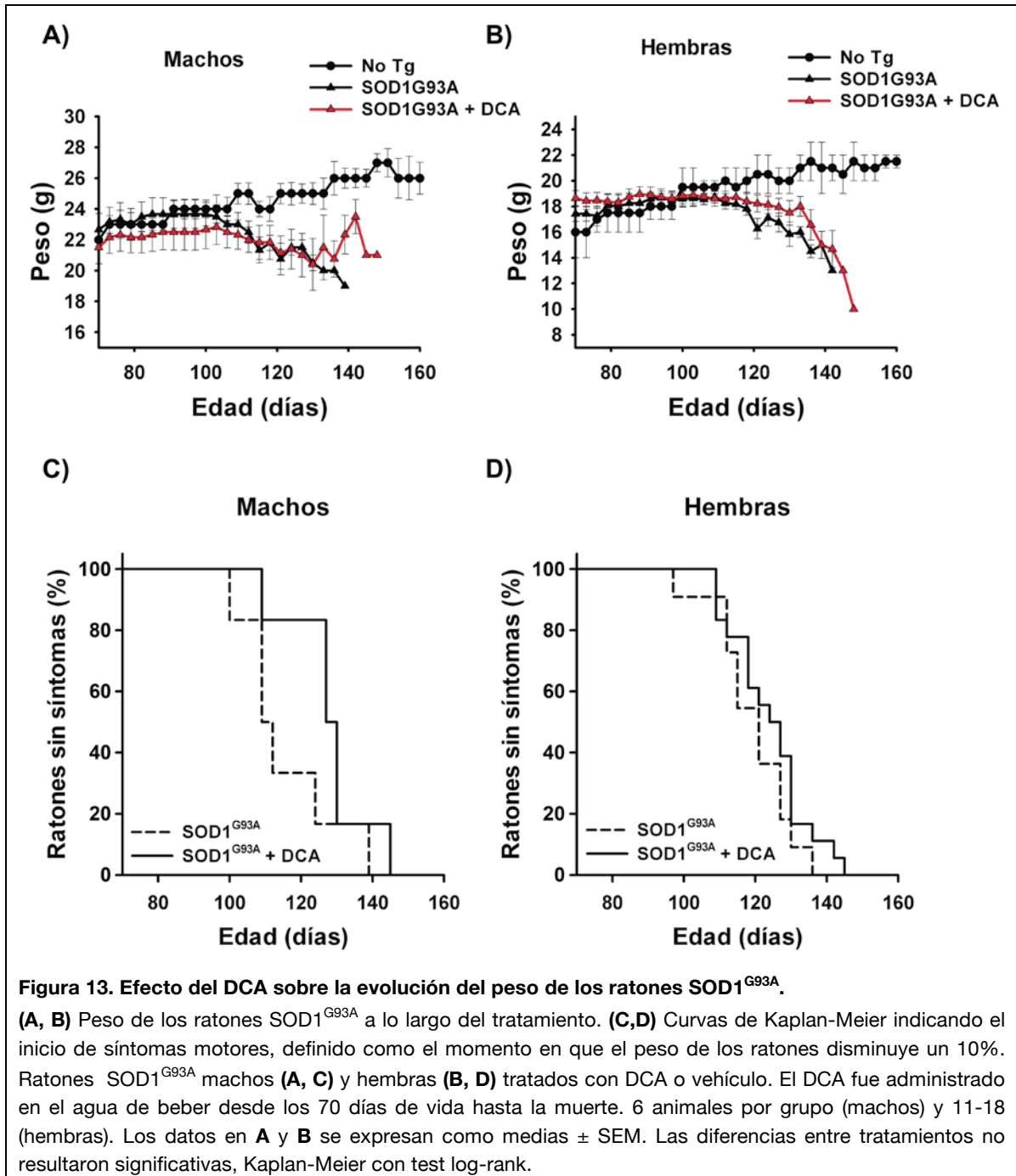
Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones SOD1^{G93A} machos (A) y hembras (B) tratados con DCA o vehículo. El DCA fue administrado en el agua de beber desde los 70 días de vida hasta la muerte. 9 animales por grupo, $p < 0.05$, Kaplan-Meier con test log-rank.

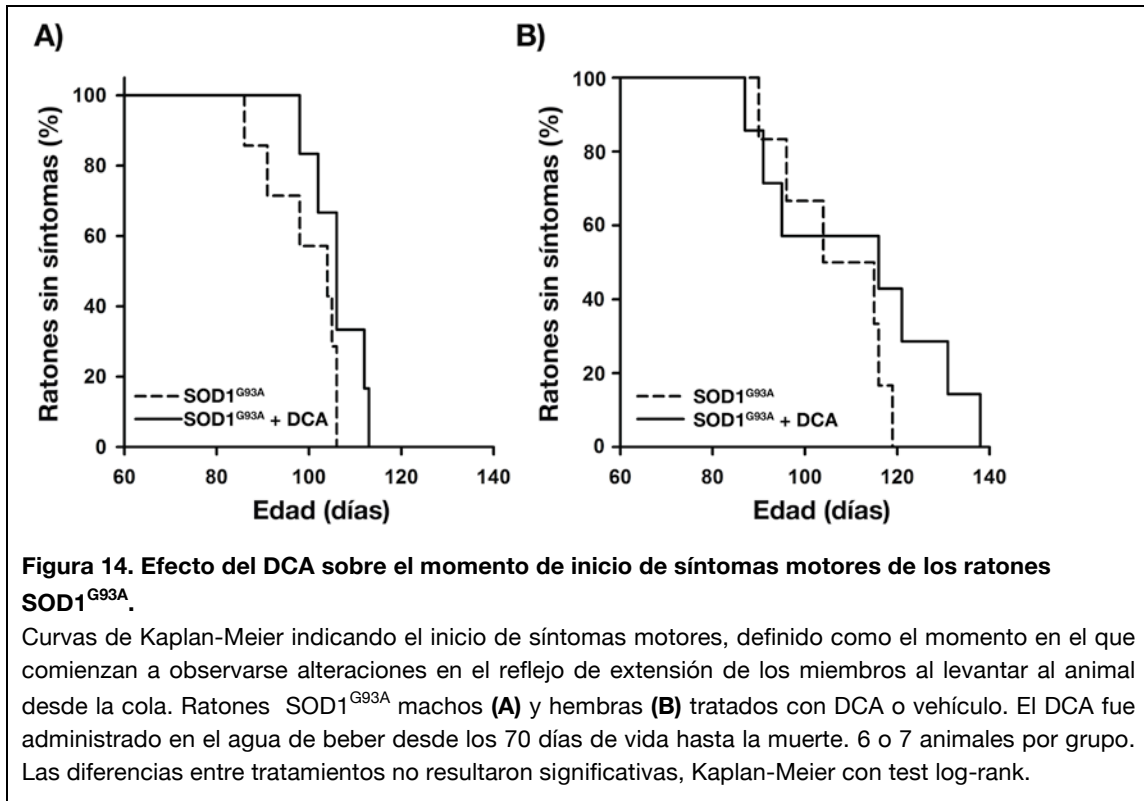
El tratamiento con DCA no retrasa el inicio de síntomas de los ratones SOD1^{G93A}

El aumento en la supervivencia observado en los ratones SOD1^{G93A} tratados con DCA podría ser consecuencia de un retraso en el desarrollo de síntomas con una evolución sintomatológica posterior similar a la habitual, o podría deberse a un enlentecimiento de la progresión de la enfermedad en la fase posterior a la manifestación externa de los síntomas.

Algunos autores definen el inicio de la enfermedad como el momento en el que se observa una disminución del 10% en el peso corporal (Miller et al., 2006; Yamanaka et al., 2008a). Para analizar los efectos del DCA en el inicio de la enfermedad utilizamos dos aproximaciones: el control del peso de los animales y la evaluación del reflejo de extensión de los miembros posteriores. En el primer caso, se tomó como criterio de inicio de síntomas la disminución del 10% del peso corporal. Observamos que el peso de los animales tratados disminuyó recién en la fase terminal de la enfermedad y además no se observaron diferencias significativas en el inicio de síntomas entre los ratones tratados con DCA y los controles (machos control n=6: 115,5 ± 5,6 días; DCA n=6: 128,0 ± 4,7 días; hembras control n=11: 119,4 ± 3,2 días; DCA n= 18: 124,2 ± 2,6 días; Figura 13).

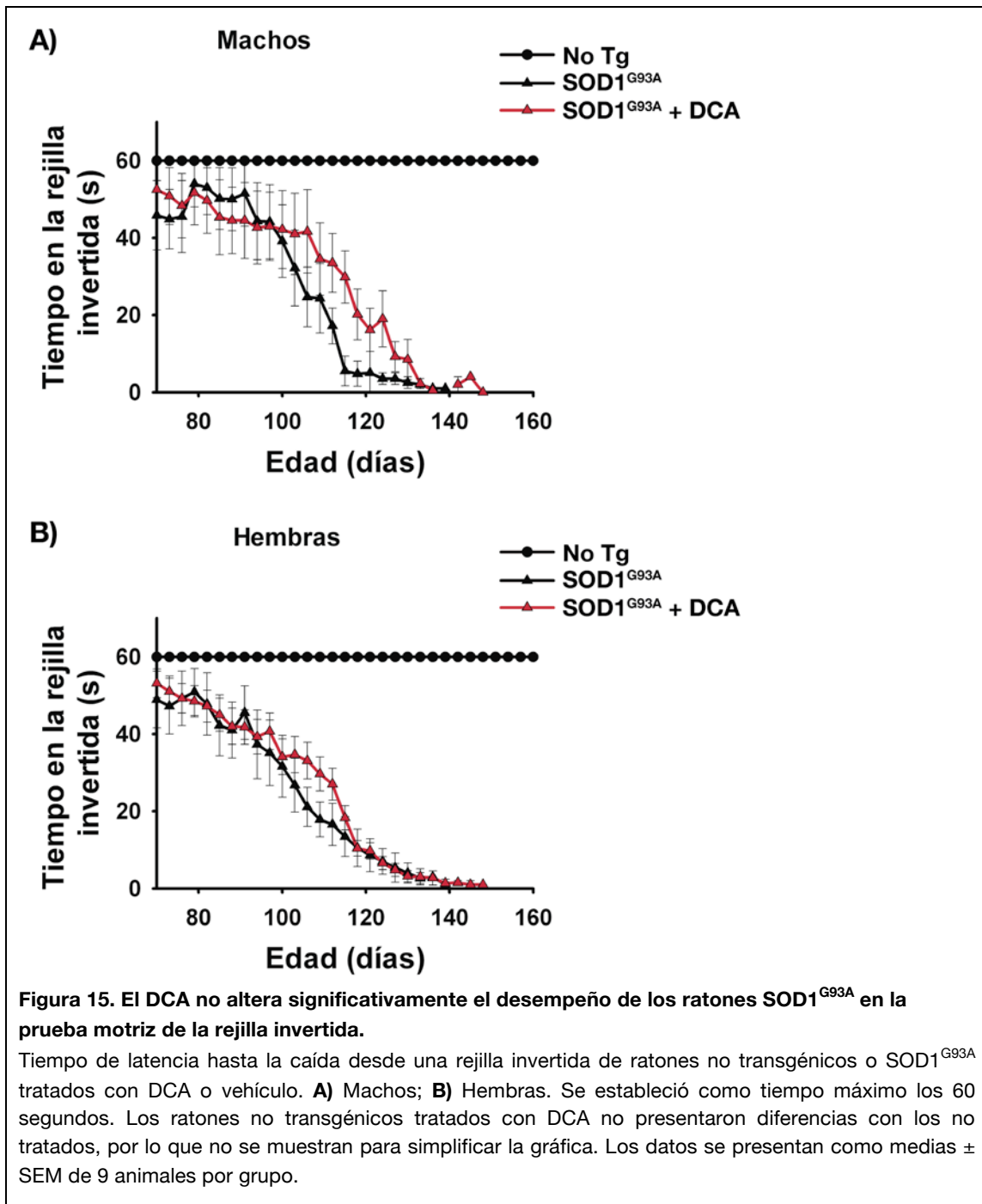
Utilizando el criterio de inicio como el momento en el que comienza a observarse un retardo en el reflejo de extensión de los miembros al levantar al animal desde la cola, se detectaron alteraciones más tempranamente que con la disminución de peso pero tampoco se encontraron diferencias significativas entre los controles y los ratones tratados con DCA (machos control n=7: 99,4 ± 3,0 días; DCA n=6: 106,2 ± 2,3 días; hembras control n=5: 104,2 ± 5,1 días; DCA n= 8: 111,3 ± 6,7 días; Figura 14).





El DCA mejora el desempeño motor de los ratones $SOD1^{G93A}$

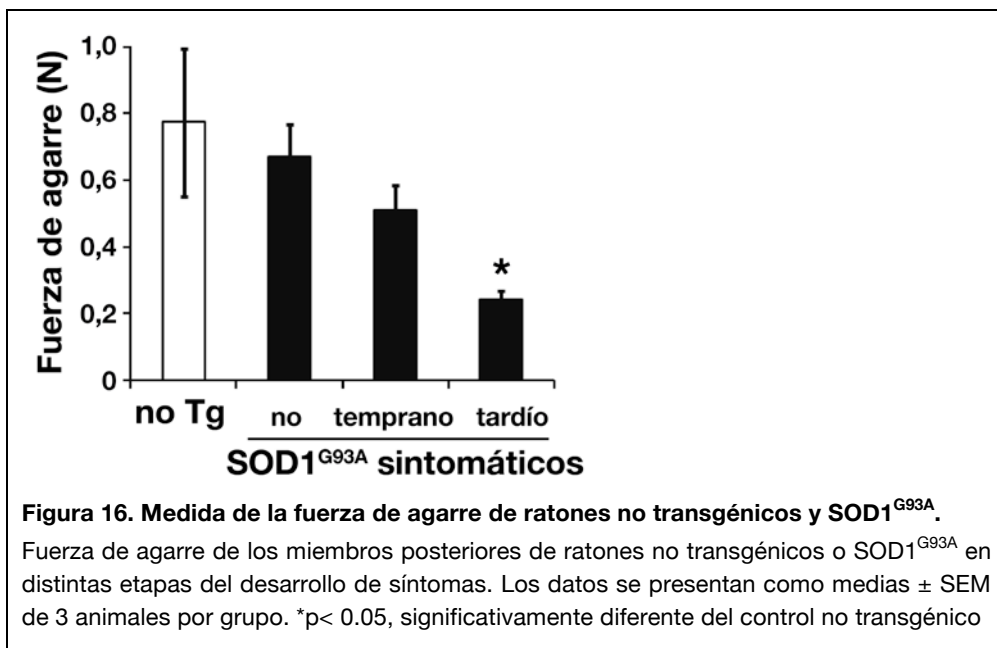
La ELA se caracteriza por una debilidad muscular y parálisis progresiva, que eventualmente conduce a un fallo respiratorio y muerte. No sólo es de interés encontrar terapias que prolonguen la vida de los pacientes sino también es importante evaluar el efecto de los tratamientos sobre la función muscular. Por ello, buscamos determinar el efecto del DCA sobre el desempeño motor de los ratones $SOD1^{G93A}$. Con este fin se realizó la prueba de la rejilla invertida a los mismos grupos de ratones utilizados para los ensayos de supervivencia. En esta prueba se mide el tiempo que los ratones permanecen suspendidos de una rejilla que ha sido invertida (Figura 15). Si bien el tratamiento con DCA parecería generar una tendencia a que los ratones $SOD1^{G93A}$ tengan un mejor desempeño en la prueba de la rejilla invertida, no se encontraron diferencias significativas en el desempeño motor de los ratones $SOD1^{G93A}$ tratados con vehículo y aquellos tratados con DCA.

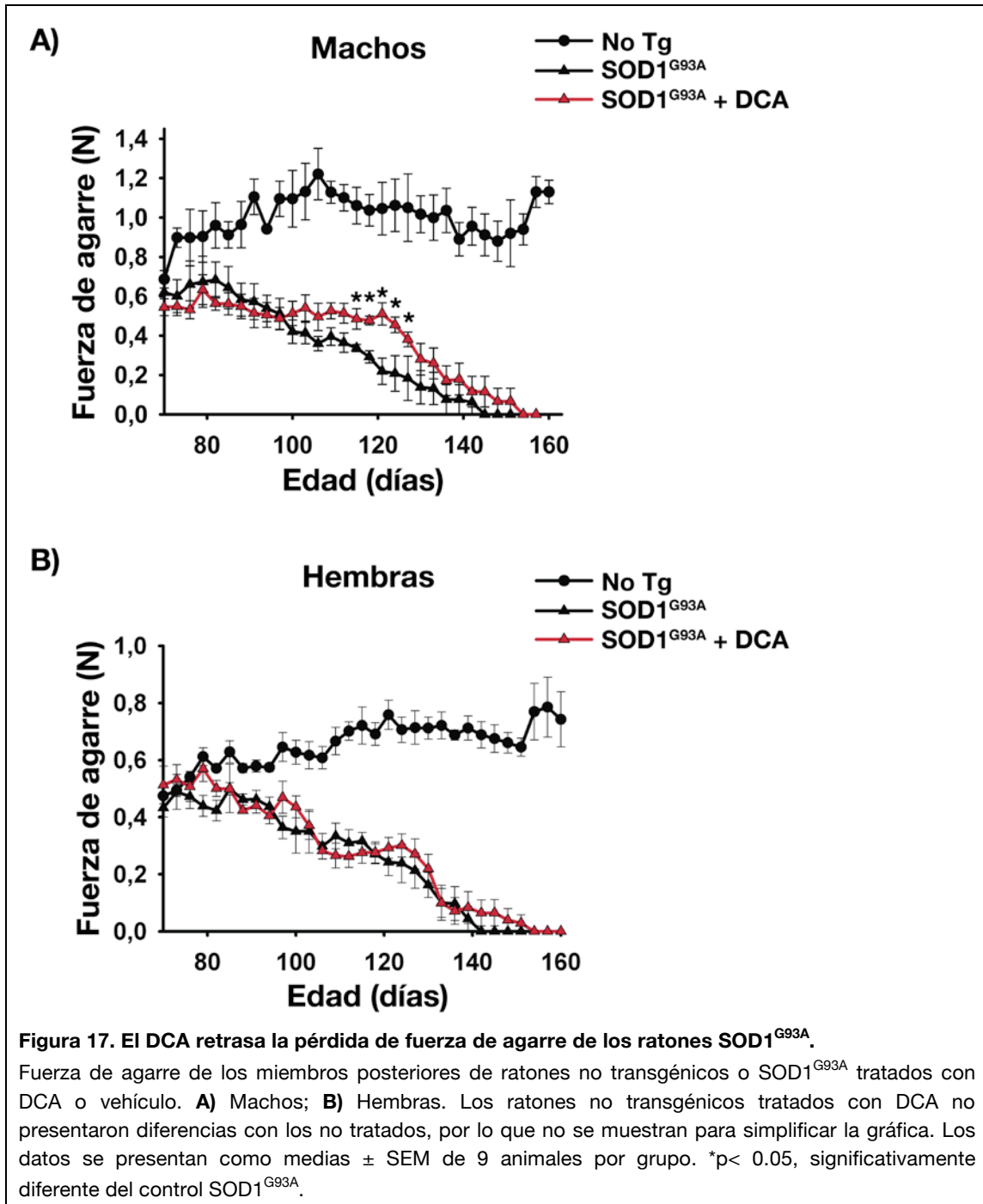


Dado que la alta variabilidad en los resultados de la prueba de la rejilla invertida podría haber provocado que la diferencia entre los animales tratados con DCA y los no tratados no resultara significativa, buscamos aplicar un método más reproducible que nos permitiera evaluar mejor el desempeño motor de los ratones. Con ese fin utilizamos un equipo medidor de la fuerza de agarre adquirido para el desarrollo de este proyecto. Previo a su aplicación en

el ensayo con DCA, pusimos a punto la prueba de medición de fuerza con un grupo reducido de animales, comprobando que este método nos permitiría diferenciar distintas etapas del desarrollo de la enfermedad (Figura 16).

A continuación se midió a lo largo del tratamiento con DCA la fuerza de agarre de los miembros posteriores de los mismos ratones utilizados para los ensayos de supervivencia (Figura 17). Se observó en los ratones SOD1^{G93A} una disminución progresiva de la fuerza de agarre a lo largo de la vida, mientras que en los no transgénicos la fuerza aumentó con la edad. El DCA mejoró significativamente la fuerza de agarre de los ratones machos en los estadios finales de la enfermedad (a partir de los 100 días de edad) en comparación con los controles transgénicos no tratados. La fuerza de agarre, sin embargo, no mejoró significativamente en las hembras.





Discusión

La expresión de SOD1 mutada induce a los astrocitos a ejercer efectos tóxicos sobre las motoneuronas. Este efecto ha sido demostrado en astrocitos aislados de rata (Vargas et al., 2006), ratón (Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007) e incluso humanos (Marchetto et al., 2008). En trabajos previos nuestro grupo demostró que la toxicidad está ligada a disfunción mitocondrial (Cassina et al., 2008). En este trabajo demostramos que el tratamiento con DCA es suficiente para revertir tanto la disfunción mitocondrial de los astrocitos aislados de ratas SOD1^{G93A} como las características que vuelven a esos astrocitos tóxicos para las motoneuronas. También demostramos que la administración sistémica de DCA a ratones SOD1^{G93A} modelo de ELA disminuye la astrocitosis, la pérdida de motoneuronas, mejora el desempeño motriz y extiende la supervivencia de los animales. Dado que el DCA ha sido utilizado en humanos por muchos años para el tratamiento de acidosis láctica y mitocondriopatías hereditarias (Stacpoole et al., 2006), estos resultados apoyan la utilización del DCA en ensayos clínicos para la ELA.

Disfunción mitocondrial en astrocitos y toxicidad

El DCA inhibe la fosforilación de PDH aportando sustratos a la fosforilación oxidativa y en consecuencia mejora la respiración mitocondrial. Aplicado en cultivo a los astrocitos SOD1^{G93A} resultó eficaz en restablecer la función mitocondrial. Esto implica que la disfunción mitocondrial en los astrocitos SOD1^{G93A} es reversible y podría ser un blanco potencial para modular la evolución de la enfermedad. A pesar de los resultados alentadores, aún resta aclarar cómo es que el DCA atenúa el daño inducido por la expresión de SOD1 mutada en los astrocitos. Las mitocondrias representan un sitio específico de acumulación de SOD1 mutada. En particular, ésta se acumula en la membrana mitocondrial externa y el espacio intermembrana, donde induce daño mitocondrial, aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y disfunción metabólica (Cassina et al., 2008; Kawamata and Manfredi, 2010). El consecuente estrés oxidativo en las mitocondrias de los astrocitos podría determinar la transformación de éstos a un fenotipo

neurotóxico (Cassina et al., 2002; Vargas et al., 2008). Se han propuesto numerosos mecanismos que podrían mediar la toxicidad de los astrocitos hacia las motoneuronas, como la disminución de la expresión de transportadores de glutamato (Rothstein, 1996), liberación de NGF que actúe a través del receptor p75 en las motoneuronas (Pehar et al., 2004) o el daño nitrooxidativo por producción de óxido nítrico y peroxinitrito (Cassina et al., 2002). Resta por investigar si el tratamiento con DCA afecta la liberación de NGF o NO, pero el tratamiento de ratones con DCA durante un tiempo prolongado induce la actividad de enzimas antioxidantes, incluyendo la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Hassoun and Gearfoss, 2011), lo que sugiere que el DCA puede presentar un efecto antioxidante indirecto y por este mecanismo disminuir la toxicidad de astrocitos. A su vez, las especies reactivas del oxígeno producidas en la mitocondria podrían afectar vías de transducción de señales a través de oxidación/reducción de residuos de cisteína en kinasas, fosfatasa y otros factores regulatorios (Burhans and Heintz, 2009) conduciendo a respuestas celulares diferentes e incluso opuestas. Al estimular el consumo de piruvato, el DCA sería capaz de mejorar el balance redox de las mitocondrias, lo cual podría resultar en la normalización de vías de señalización que han mostrado ser reguladas a nivel de la mitocondria, como las vías de ERK (proteín quinasa regulada por señales extracelulares), Akt y proteín quinasa c (PKC) (Antico Arciuch et al., 2009a).

DCA y modulación metabólica

Además de disfunción mitocondrial, los astrocitos SOD1^{G93A} presentan una tasa de proliferación aumentada (Gandelman et al., 2010). Aunque estos dos eventos parecerían desconectados, existe evidencia obtenida con células cancerígenas que sugiere que están relacionados. Otto Warburg en la década de 1920 describió que la elevada tasa de proliferación observada en las células tumorales se encuentra asociada a una remodelación metabólica caracterizada por un metabolismo glicolítico y fermentación láctica citosólica en vez de a la oxidación mitocondrial del piruvato (Warburg et al., 1927), lo que se denominó “efecto Warburg”. Trabajos en los que se trataron numerosas líneas celulares

tumorales con DCA han demostrado que este compuesto revierte el metabolismo glucolítico al mismo tiempo que reduce la proliferación de estas células (Bonnet et al., 2007). En este trabajo demostramos que el tratamiento con DCA de astrocitos SOD1^{G93A} mejora su función mitocondrial y además tenemos evidencias de que al mismo tiempo disminuye su tasa de proliferación (datos obtenidos por Laura Martínez y publicados en (Miquel et al., 2012)), lo que sugiere la activación de vías de transducción de señales comunes entre células tumorales y astrocitos SOD1^{G93A}. Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha encontrado evidencia de proliferación desregulada y falta de senescencia replicativa en una población de células inmunorreactivas para marcadores de astrocitos, con un fenotipo aberrante altamente tóxico para motoneuronas, aisladas de ratas SOD1^{G93A} adultas sintomáticas (Diaz-Amarilla et al., 2011). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la disfunción mitocondrial crónica de los astrocitos neonatales promueva cambios a largo plazo en el fenotipo astrocitario que determine el crecimiento descontrolado de los astrocitos con potencial neurotóxico.

Numerosas vías celulares podrían mediar el aumento en la tasa de proliferación de los astrocitos SOD1^{G93A}. Una de ellas puede ser la activación de la expresión de la subunidad A de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH-A). LDH es un tetrámero formado a partir de subunidades LDH-A o LDH-B, los que según su proporción cambian la actividad del complejo, de manera que la subunidad LDH-A promueve la conversión de piruvato a lactato y la LDH-B la vía contraria. La expresión de LDH-A aumenta en células tumorales en respuesta a HIF-1 y c-Myc y su inhibición lleva a la una disminución del crecimiento tumoral (Seth et al., 2011). Otra vía involucrada podría ser la inactivación de la E3 ubiquitin ligasa APC/C-Cdh1, la cual participa en la regulación del ciclo celular mediante la continua degradación de proteínas que presenten un motivo denominado KEN box, siendo necesaria su inactivación para el inicio de la fase S. La actividad glucolítica de los astrocitos depende de la actividad de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa isoforma 3 (PFKFB3), la cual contiene una KEN box y podría ser blanco de degradación por APC/C-Cdh1, vinculando así la glucólisis y la proliferación celular (Almeida

et al., 2010). Por último, el aumento de la proliferación podría ser regulado por la modulación de vías de transducción mediada por mitocondrias despolarizadas. Este efecto dependería de cambios en la fosforilación de Akt, una Ser/Thr quinasa con un papel importante como regulador de la proliferación celular. La activación de Akt depende de su fosforilación, la cual ocurre en distintos sitios de fosforilación en forma secuencial. Uno de los pasos de la fosforilación de Akt ocurre en la mitocondria y sería susceptible de modulación en función del estado redox mitocondrial, desencadenando distintas respuestas celulares como la proliferación o muerte celular (Antico Arciuch et al., 2009b).

Además de en los modelos animales, en los pacientes de ELA también existe una alteración del metabolismo redox mitocondrial. De hecho, estudios metabolómicos recientes del líquido cefalorraquídeo (Blasco et al., 2010) y del suero (Kumar et al., 2010) de pacientes de ELA con espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H , han revelado patrones anormales de metabolitos que podrían indicar una perturbación del metabolismo de la glucosa. Una de las aproximaciones que se ha ensayado para la restauración de la función mitocondrial y producción de energía es la administración de piruvato a ratones ELA (Esposito et al., 2007; Park et al., 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos a la fecha han resultado contradictorios, probablemente debido a diferencias en las dosis y cepas utilizadas. No obstante, la administración crónica de DCA a ratones $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ mejoró la función mitocondrial en la médula espinal, indicando que la disfunción mitocondrial descrita en estos animales es susceptible de ser revertida.

Modulación mitocondrial *in vivo*

El restablecimiento de la actividad mitocondrial en la médula espinal de los animales tratados con DCA se asoció a un retraso en la muerte de los mismos, lo cual demuestra que la modulación de la actividad mitocondrial es capaz de modificar el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de haber iniciado el tratamiento 20 días previos al inicio aproximado de síntomas, no se observó un retraso en el inicio de los mismos. Esto sugiere que los efectos del

DCA enlentecen el desarrollo de la enfermedad en la etapa sintomática. Si analizamos el proceso patológico de neurodegeneración, el inicio y la progresión de la enfermedad representan diferentes fases de la misma definidas por la acción de la SOD1 mutada en diferentes tipos celulares, como ha sido demostrado con la escisión selectiva del transgen SOD1^{G93A} en tipos celulares particulares (Ilieva et al., 2009). La inhibición de la expresión de SOD1 mutada exclusivamente en motoneuronas determinó un retraso en el inicio de la enfermedad mientras que la inhibición de su expresión únicamente en microglía retardó la progresión de la misma en etapas tardías sin afectar el inicio (Boillee et al., 2006). Incluso existen reportes que han logrado revertir los daños centrales (población neuronal, gliosis) pero no la axonopatía periférica (Gould et al., 2006), indicando que ambos eventos obedecen a mecanismos diferentes en la patología de la enfermedad.

En este trabajo consideramos el inicio de la enfermedad como la observación de un reflejo patológico. A diferencia de lo que otros autores han reportado, la disminución del peso no parece ser un buen indicador de inicio de la enfermedad en los ratones SOD1^{G93A} utilizados en este trabajo, ya que en un elevado número de ratones recién pudo observarse tal disminución cuando los síntomas motores eran francamente evidentes. Esto podría deberse a que en estos ratones existe una alta expresión del transgen y ocurre una evolución mucho más rápida de los síntomas, mientras que en otras cepas de ratón utilizadas como modelo de ELA la SOD1 mutada tiene menores niveles de expresión y la evolución de los síntomas es mucho más lenta. El otro criterio de inicio de síntomas utilizado, la observación de alteraciones en el reflejo de extensión de los miembros posteriores al levantar al animal de la cola, si bien *a priori* parecería sujeto a mayor variabilidad por depender del observador, permitió observar una mayor concordancia entre la observación de alteraciones y los datos de la medida de fuerza de los animales.

Los efectos beneficiosos del DCA sobre el desempeño motor de los ratones fueron más pronunciados en los machos que en las hembras. Se han descrito resultados similares en otros estudios en los que diferentes aproximaciones

generaron resultados beneficiosos únicamente en machos (Naumenko et al., 2011). Los hombres presentan un riesgo mayor de desarrollar ELA que las mujeres (Haverkamp et al., 1995) y también se han reportado diferencias sexuales en ratas (Suzuki et al., 2007) y ratones (Cudkowicz et al., 2002; Kirkinezos et al., 2003; Mahoney et al., 2004; Alves et al., 2011) que expresan la mutación SOD1^{G93A}, particularmente cuando se comparan grandes números de animales (Heiman-Patterson et al., 2011). Estas observaciones sugieren que las diferencias entre machos y hembras observadas en este trabajo podrían ser al menos en parte resultado de la acción de hormonas sexuales. De hecho, se ha observado que los estrógenos pueden modular la progresión de la enfermedad en los ratones SOD1^{G93A} (Trieu and Uckun, 1999; Groeneveld et al., 2004). Entre los variados mecanismos neuroprotectores propuestos para explicar la acción de los estrógenos, resulta particularmente interesante en este contexto su capacidad de modular la función mitocondrial y el estrés oxidativo (Arnold et al., 2012). Se ha planteado que los estrógenos afectan la producción mitocondrial de energía y EROs por dos vías: la vía clásica del receptor de estrógenos, con efectos a largo plazo y la vía no clásica, con efectos a corto plazo. La vía clásica involucra la cooperación entre el genoma nuclear y el mitocondrial, con los receptores de estrógenos coordinando la regulación de la expresión de genes nucleares y mitocondriales que codifican para proteínas del complejo respiratorio mitocondrial. La vía no clásica se caracteriza por la interacción directa de los estrógenos con las subunidades de los complejos de respiración mitocondrial e influyendo vías de señalización intracelular, como la de calcio y MAPK, que a su vez afectan la expresión y actividad de proteínas mitocondriales (Arnold et al., 2012). Por otro lado, en ratas ovariectomizadas se ha observado una disminución en la expresión y actividad de enzimas metabólicas mitocondriales (principalmente PDH y citocromo c oxidasa), menor respiración mitocondrial y un aumento del estrés oxidativo a nivel del cerebro (Yao et al., 2010; Yao et al., 2012) y ratas machos tratadas con estrógeno en condiciones de trauma-hemorragia presentan una mayor expresión génica y actividad del complejo IV mitocondrial, efectos mediados por el receptor de estrógenos ER β a nivel de la mitocondria (Hsieh

et al., 2006). Además, el hecho de que se han detectado niveles de EROs aumentados en machos $SOD1^{G93A}$ pero no en hembras (Naumenko et al., 2011) sugiere que en las últimas el balance redox entre mecanismos pro y anti oxidantes se encuentra de antemano desplazado hacia la neuroprotección, posiblemente enmascarando los efectos beneficiosos del DCA.

Efectos del DCA sobre otros tipos celulares

En el sistema nervioso central los astrocitos parecerían responder preferencialmente al tratamiento con DCA debido a que presentan una mayor proporción de la PDH total en su forma fosforilada, inactiva, que las neuronas, como se mencionó en la introducción (Itoh, 2003). Sin embargo, al administrar el DCA de manera sistémica no podemos excluir la modulación mitocondrial en otros tipos celulares relevantes para la ELA. Nosotros observamos un aumento en la población de motoneuronas en la médula espinal de los animales tratados con DCA, lo cual sugiere que el tratamiento con DCA retardó la muerte neuronal. Probablemente el mecanismo involucrado no haya implicado la restauración de la actividad mitocondrial neuronal sino que haya sido en forma indirecta a través de la estimulación de la actividad neurotrófica de los astrocitos u otros tipos celulares dado que a diferencia de los astrocitos, las neuronas con mitocondrias disfuncionantes sufren apoptosis (Almeida et al., 2001). Por otro lado, el DCA podría también presentar un efecto directo sobre el músculo esquelético. En este trabajo, los animales tratados con DCA mantuvieron una mayor fuerza de agarre que los no tratados asociado a una mayor preservación de las uniones neuromusculares ((Miquel et al., 2012)). Esto hace pensar que el DCA podría tener un efecto directo sobre el músculo estriado, un tejido donde la función mitocondrial es relevante. Otros autores han reportado que el DCA puede ser efectivo en la recuperación de la función del músculo isquémico (Wilson et al., 2003), lo que sugiere que podría tener un papel trófico directo para el músculo o disminuir su inflamación.

Uso potencial del DCA en otras enfermedades neurodegenerativas

El DCA también ha presentado un efecto protector en modelos de otra enfermedad neurodegenerativa, la enfermedad de Huntington, lo cual sugiere que los mecanismos de progresión de la muerte neuronal en las distintas enfermedades neurodegenerativas son similares (Andreassen et al., 2001). También en la enfermedad de Huntington se ha descrito reactividad astrocitaria y disfunción mitocondrial (Hsiao and Chern, 2010; Kim et al., 2010). A su vez, efectos tóxicos de astrocitos han sido descritos en otras enfermedades neurodegenerativas por nuestro grupo (Saez et al., 2006) y otros (Schwab and McGeer, 2008). Esto sugiere que el DCA podría tener un efecto beneficioso en otras enfermedades neurodegenerativas. Por otra parte, el DCA ha mostrado ser efectivo en disminuir el tamaño de glioblastomas no tratables en un estudio en humanos (Michelakis et al., 2010). Los gliomas resultan de la proliferación descontrolada de astrocitos que presentan a su vez remodelación metabólica, con aumento de la fermentación citosólica y disminución de la fosforilación oxidativa mitocondrial. En suma, la evidencia parece indicar que la modulación metabólica podría resultar efectiva para la progresión de enfermedades donde se ha demostrado la proliferación de astrocitos con mitocondrias disfuncionantes.

Conclusión

Este trabajo aporta evidencia para el uso del DCA en el tratamiento de la ELA, una enfermedad incurable para la cual no existen terapias. Resta por establecer si tratamientos en conjunto con antioxidantes, Riluzol u otros fármacos que han demostrado efectos beneficiosos podrían resultar más efectivos. El hecho de ser un compuesto ya utilizado en seres humanos resulta interesante puesto que acorta la brecha entre los resultados del laboratorio y su aplicación en humanos.

Perspectivas

Como fue mencionado previamente, la mitocondria es uno de los principales sitios de producción de especies reactivas del oxígeno, por lo que es posible que las alteraciones en la actividad mitocondrial sean en parte consecuencia de un excesivo daño nitrooxidativo en la mitocondria. Algunos antioxidantes que protegen indirectamente a la mitocondria han demostrado ser útiles en aminorar la progresión de los síntomas en un modelo animal de ELA (Liu et al., 2002; Wu et al., 2003), pero una limitación importante de la terapia antioxidante es la incapacidad de aumentar las concentraciones de antioxidantes dentro de la mitocondria. Una terapia efectiva para enfermedades como la ELA podría ser la de atenuar de manera selectiva el daño oxidativo dentro de la mitocondria (Murphy and Smith, 2000). Recientemente se han desarrollado antioxidantes dirigidos a la mitocondria, ubiquinona y carboxi proxil nitróxido acoplados al catión trifenilfosfonio (Mito-Q y Mito-CP, respectivamente), lo cual hace que estos compuestos sean incorporados preferencialmente en el organelo (Kelso et al., 2001; Dhanasekaran et al., 2005). Nuestro grupo ha demostrado previamente que el tratamiento de los astrocitos SOD1^{G93A} con los antioxidantes mitocondriales restablece la función mitocondrial, reduce los marcadores de estrés oxidativo y restituye la actividad trófica para motoneuronas (Cassina et al., 2008). Resulta de interés extender estos hallazgos a un modelo animal, para determinar si el tratamiento con estos compuestos puede prolongar la supervivencia o atrasar el inicio de síntomas en el modelo de ratón mutante. De ser así, sería un complemento importante al presente trabajo, demostrando que el restablecimiento de la función mitocondrial por dos vías diferentes (mediante el aporte de sustratos a la mitocondria o el tratamiento con antioxidantes mitocondriales) tendría efectos beneficiosos en modelos de ELA. Esto apoyaría fuertemente el rol de la disfunción mitocondrial en el desarrollo de la enfermedad y establecería a las mitocondrias como un blanco auspicioso para futuras estrategias terapéuticas.

En este trabajo hemos utilizado el DCA como una herramienta para la estimulación de la actividad del complejo PDH mediante la inhibición de la quinasa PDK. Para caracterizar de mejor manera los efectos observados, sería útil la utilización de otras técnicas más específicas con las que lograr el mismo objetivo. Existen varias isoformas de PDK (PDK1-4), cuya expresión varía dependiendo del tejido y del tipo celular. Las motoneuronas expresan únicamente PDK1 y PDK3, mientras que los astrocitos tienen altos niveles de expresión de PDK2 y PDK4 (Halim et al., 2010). Por lo tanto, existe la posibilidad de inhibir la expresión de las isoformas de PDK de mayor expresión en los astrocitos utilizando ARN interferente. Los ARNi para PDK podrían incorporarse directamente a los astrocitos *in vitro* (como shARN que será procesado intracelularmente) y luego evaluar su efecto sobre el fenotipo astrocitario y su neurotoxicidad. Para evaluar sus efectos *in vivo* podría recurrirse a vectores virales que expresen dichos ARNi. En este trabajo el DCA fue administrado en forma sistémica, afectando potencialmente a todas las células del organismo, con lo que, a pesar de las fuertes evidencias presentadas, no pudimos asegurar que el efecto observado fue realmente consecuencia de cambios a nivel de los astrocitos. La inhibición de PDK utilizando vectores virales tiene la ventaja de permitir la expresión del ARNi en un único tipo celular al poder utilizar promotores específicos, con lo que se puede lograr la inhibición de PDK únicamente en astrocitos. Así podríamos lograr la confirmación de que el mecanismo principal por el cual el DCA extiende la supervivencia de los ratones SOD1^{G93A} implica cambios en el fenotipo astrocitario.

Publicaciones

Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron publicados en:

Miquel E, Cassina A, Martínez-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. 2012; 7:e34776.

Una copia de este artículo fue adjuntada al final de esta tesis.

También fueron expuestos como pósteres en:

- Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Gandelman M, Radi R, Barbeito L, Cassina P.

“Dichloroacetate (DCA) improves mitochondrial dysfunction and prevents astrocyte-mediated motor neuron loss in ALS models”.

Society for Neuroscience annual meeting. Chicago, Illinois, USA, 2009.

- Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Gandelman M, Bolatto C, Radi R, Barbeito L, Cassina P.

“El dicloroacetato restablece la función mitocondrial en modelos de Esclerosis Lateral Amiotrófica”.

Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. Montevideo, 2009.

- Miquel E, Cassina A, Martínez-Palma L, Gandelman M, Radi R, Barbeito L, Cassina P.

“Estrategias para restablecer la función mitocondrial en modelos de Esclerosis Lateral Amiotrófica”.

XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Piriápolis, Maldonado, 2010.

Referencias

- Abemayor E, Kovachich GB, Haugaard N (1984) Effects of dichloroacetate on brain pyruvate dehydrogenase. *J Neurochem* 42:38-42.
- Afifi AK, Aleu FP, Goodgold J, MacKay B (1966) Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 16:475-481.
- Almeida A, Bolanos JP, Moncada S (2010) E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:738-741.
- Almeida A, Almeida J, Bolanos JP, Moncada S (2001) Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15294-15299.
- Alves CJ, de Santana LP, dos Santos AJ, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, Martins RS, Maximino JR, Chadi G (2011) Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res* 1394:90-104.
- Andreassen OA, Ferrante RJ, Huang HM, Dedeoglu A, Park L, Ferrante KL, Kwon J, Borchelt DR, Ross CA, Gibson GE, Beal MF (2001) Dichloroacetate exerts therapeutic effects in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Ann Neurol* 50:112-117.
- Antico Arciuch VG, Alippe Y, Carreras MC, Poderoso JJ (2009a) Mitochondrial kinases in cell signaling: Facts and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 61:1234-1249.
- Antico Arciuch VG, Galli S, Franco MC, Lam PY, Cadenas E, Carreras MC, Poderoso JJ (2009b) Akt1 intramitochondrial cycling is a crucial step in the redox modulation of cell cycle progression. *PLoS ONE* 4:e7523.
- Arnold S, Victor MB, Beyer C (2012) Estrogen and the regulation of mitochondrial structure and function in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Bachmanov AA, Reed DR, Beauchamp GK, Tordoff MG (2002) Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behavior genetics* 32:435-443.
- Barbeito AG, Martinez-Palma L, Vargas MR, Pehar M, Manay N, Beckman JS, Barbeito L, Cassina P (2010) Lead exposure stimulates VEGF expression in the spinal cord and extends survival in a mouse model of ALS. *Neurobiol Dis* 37:574-580.
- Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estévez AG, Beckman JS (2004) A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research Reviews* 47:263-274.
- Beach TG, Walker R, McGeer EG (1989) Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia* 2:420-436.
- Bezzi P, Volterra A (2001) A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol* 11:387-394.
- Blasco H, Corcia P, Moreau C, Veau S, Fournier C, Vourc'h P, Emond P, Gordon P, Pradat PF, Praline J, Devos D, Nadal-Desbarats L, Andres CR (2010) 1H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 5:e13223.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW (2006) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312:1389-1392.
- Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED (2007) A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11:37-51.
- Bratic A, Larsson NG (2013) The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* 123:951-957.
- Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Goldman JE, Messing A (2001) Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* 27:117-120.
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27:723-749.

- Burhans WC, Heintz NH (2009) The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med* 47:1282-1293.
- Cassina P, Peluffo H, Pehar M, Martinez-Palma L, Ressia As, Beckman JS, Estevez AG, Barbeito L (2002) Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *Journal of Neuroscience Research* 67:21-29.
- Cassina P, Pehar M, Vargas MR, Castellanos R, Barbeito AG, Estevez AG, Thompson JA, Beckman JS, Barbeito L (2005) Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry* 93:38-46.
- Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, de Leon A, Robinson KM, Mason RP, Beckman JS, Barbeito L, Radi R (2008) Mitochondrial Dysfunction in SOD1G93A-Bearing Astrocytes Promotes Motor Neuron Degeneration: Prevention by Mitochondrial-Targeted Antioxidants. *Journal of Neuroscience* 28:4115-4122.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Jr., Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302:113-117.
- Cudkowicz ME, Pastusza KA, Sapp PC, Mathews RK, Leahy J, Pasinelli P, Francis JW, Jiang D, Andersen JK, Brown RH, Jr. (2002) Survival in transgenic ALS mice does not vary with CNS glutathione peroxidase activity. *Neurology* 59:729-734.
- Deng HX, Shi Y, Furukawa Y, Zhai H, Fu R, Liu E, Gorrie GH, Khan MS, Hung WY, Bigio EH, Lukas T, Dal Canto MC, O'Halloran TV, Siddique T (2006) Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7142-7147.
- Dhanasekaran A, Kotamraju S, Karunakaran C, Kalivendi SV, 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* 39:567-583.
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Egan K (2007) Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10:608-614.
- Diaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martinez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L (2011) Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18126-18131.
- Dringen R, Hirrlinger J (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem* 384:505-516.
- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Oudart H, de Tapia M, Barbeito L, Loeffler JP (2004) Mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis: a trigger and a target. *Neurodegener Dis* 1:245-254.
- Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54:15-36.
- Esposito E, Capasso M, di Tomasso N, Corona C, Pellegrini F, Uncini A, Vitaglione P, Fogliano V, Piantelli M, Sensi SL (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 Res* 1168:90-96.
- Field LS, Furukawa Y, O'Halloran TV, Culotta VC (2003) Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *J Biol Chem* 278:28052-28059.
- Gandelman M, Peluffo H, Beckman JS, Cassina P, Barbeito L (2010) Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 7:33.
- Gnaiger E (2007) *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control*. OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck:96pp.
- Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL (2000) Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 20:660-665.
- Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW (2006) Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26:8774-8786.

- Green AJ, Harvey RJ, Thompson EJ, Rossor MN (1997) Increased S100beta in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia. *Neurosci Lett* 235:5-8.
- Groeneveld GJ, Van Muiswinkel FL, Sturkenboom JM, Wokke JH, Bar PR, Van den Berg LH (2004) Ovariectomy and 17beta-estradiol modulate disease progression of a mouse model of ALS. *Brain Res* 1021:128-131.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-1775.
- Halim ND, McFate T, Mohyeldin A, Okagaki P, Korotchkina LG, Patel MS, Jeoung NH, Harris RA, Schell MJ, Verma A (2010) Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia* 58:1168-1176.
- Hassoun EA, 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 exposure. *Toxicol Environ Chem* 93:332-344.
- Haverkamp LJ, Appel V, Appel SH (1995) Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain* 118 (Pt 3):707-719.
- Heiman-Patterson TD, Sher RB, Blankenhorn EA, Alexander G, Deitch JS, Kunst CB, Maragakis N, Cox G (2011) Effect of genetic background on phenotype variability in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis: a window of opportunity in the search for genetic modifiers. *Amyotroph Lateral Scler* 12:79-86.
- Heiman-Patterson TD, Deitch JS, Blankenhorn EP, Erwin KL, Perreault MJ, Alexander BK, Byers N, Toman I, Alexander GM (2005) Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)1Gur mouse model of ALS. *J Neurol Sci* 236:1-7.
- Henderson CE, Bloch-Gallego E, Camu W (1995) Purified embryonic motoneurons. In: *Neural cell culture: a practical approach* (Cohen J, Wilkin G, eds), pp 69-80: Oxford University Press, USA.
- Higgins CM, Jung C, Ding H, Xu Z (2002) Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci* 22:RC215.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD (2002) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1604-1609.
- Hsiao HY, Chern Y (2010) Targeting glial cells to elucidate the pathogenesis of Huntington's disease. *Molecular neurobiology* 41:248-255.
- Hsieh YC, Yu HP, Suzuki T, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH (2006) Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *Journal of molecular and cellular cardiology* 41:511-521.
- Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *The Journal of Cell Biology* 187:761-772.
- Itoh Y (2003) Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:4879-4884.
- Jaarsma D, Teuling E, Haasdijk ED, De Zeeuw CI, Hoogenraad CC (2008) Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase Is Sufficient to Induce Amyotrophic Lateral Sclerosis in Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience* 28:2075-2088.
- Jaarsma D, Rognoni F, van Duijn W, Verspaget HW, Haasdijk ED, Holstege JC (2001) CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta neuropathologica* 102:293-305.
- Jung C, Higgins CM, Xu Z (2002) Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 83:535-545.
- Kawamata H, Manfredi G (2010) Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mech Ageing Dev* 131:517-526.

- Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, Smith RA, Murphy MP (2001) Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem* 276:4588-4596.
- Kim J, Moody JP, Edgerly CK, Bordiuk OL, Cormier K, Smith K, Beal MF, Ferrante RJ (2010) Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 19:3919-3935.
- Kirkinezos IG, Hernandez D, Bradley WG, Moraes CT (2003) Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 53:804-807.
- Kirkinezos IG, Hernandez D, Bradley WG, Moraes CT (2004) An ALS mouse model with a permeable blood-brain barrier benefits from systemic cyclosporine A treatment. *Journal of Neurochemistry* 88:821-826.
- Klivenyi P, Ferrante RJ, Matthews RT, Bogdanov MB, Klein AM, Andreassen OA, Mueller G, Wermer M, Kaddurah-Daouk R, Beal MF (1999) Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* 5:347-350.
- Knoechel TR, Tucker AD, Robinson CM, Phillips C, Taylor W, Bungay PJ, Kasten SA, Roche TE, Brown DG (2006) Regulatory roles of the N-terminal domain based on crystal structures of human pyruvate dehydrogenase kinase 2 containing physiological and synthetic ligands. *Biochemistry* 45:402-415.
- Kumar A, Bala L, Kalita J, Misra UK, Singh RL, Khetrapal CL, Babu GN (2010) Metabolomic analysis of serum by (1) H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Chim Acta* 411:563-567.
- Kushner PD, Stephenson DT, Wright S (1991) Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 50:263-277.
- Levine JB, Kong J, Nadler M, Xu Z (1999) Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia* 28:215-224.
- Lino MM, Schneider C, Caroni P (2002) Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci* 22:4825-4832.
- Liu J, Lillo C, Jonsson PA, Vande Velde C, Ward CM, Miller TM, Subramaniam JR, Rothstein JD, Marklund S, Andersen PM, Brannstrom T, Gredal O, Wong PC, Williams DS, Cleveland DW (2004) Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* 43:5-17.
- Liu R, Li B, Flanagan SW, Oberley LW, 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. *J Neurochem* 80:488-500.
- Ludolph AC, Bendotti C, Blaugrund E, Chio A, Greensmith L, Loeffler J-P, Mead R, Niessen HG, Petri S, Pradat P-F, Robberecht W, Ruegg M, Schwalenstöcker B, Stiller D, van den Berg L, Vieira F, von Horsten S (2010) Guidelines for preclinical animal research in ALS/MND: A consensus meeting. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 11:38-45.
- Magrane J, Hervias I, Henning MS, Damiano M, Kawamata H, Manfredi G (2009) Mutant SOD1 in neuronal mitochondria causes toxicity and mitochondrial dynamics abnormalities. *Hum Mol Genet* 18:4552-4564.
- Mahoney DJ, Rodriguez C, Devries M, Yasuda N, Tarnopolsky MA (2004) Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 29:656-662.
- Manfredi G, Xu Z (2005) Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion* 5:77-87.
- Marchetto MC, Muotri AR, Mu Y, Smith AM, Cezar GG, Gage FH (2008) Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 3:649-657.
- Martin DL (1992) Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 5:81-94.
- Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, Manfredi G (2002) Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 277:29626-29633.
- Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Dong L, Figlewicz DA, Shaw PJ (2002) Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 125:1522-1533.

- Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, Maguire C, Gammer TL, Mackey JR, Fulton D, Abdulkarim B, McMurtry MS, Petruk KC (2010) Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Science translational medicine* 2:31ra34.
- Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH (2007) Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*:CD001447.
- Miller TM, Kaspar BK, Kops GJ, Yamanaka K, Christian LJ, Gage FH, Cleveland DW (2005) Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology* 57:773-776.
- Miller TM, Kim SH, Yamanaka K, Hester M, Umapathi P, Arnson H, Rizo L, Mendell JR, Gage FH, Cleveland DW, Kaspar BK (2006) Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19546-19551.
- Miquel E, Cassina A, Martinez-Palma L, Bolatto C, Trias 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:e34776.
- Morten KJ, Caky M, Matthews PM (1998) Stabilization of the pyruvate dehydrogenase E1alpha subunit by dichloroacetate. *Neurology* 51:1331-1335.
- Murphy MP, Smith RA (2000) Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 41:235-250.
- Murphy S, Pearce B (1987) Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neuroscience* 22:381-394.
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S (2007) Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nature Neuroscience* 10:615-622.
- Nagy D, Kato T, Kushner PD (1994) Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 38:336-347.
- Naumenko N, Pollari E, Kurronen A, Giniatullina R, Shakirzyanova A, Magga J, Koistinaho J, Giniatullin R (2011) Gender-Specific Mechanism of Synaptic Impairment and Its Prevention by GCSF in a Mouse Model of ALS. *Front Cell Neurosci* 5:26.
- Norenberg MD (1994) Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:213-220.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276:38388-38393.
- Park JH, Hong YH, Kim HJ, Kim SM, Kim MJ, Park KS, Sung JJ, Lee KW (2007) Pyruvate slows disease progression in a G93A SOD1 mutant transgenic mouse model. *Neurosci Lett* 413:265-269.
- Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Castellanos R, Viera L, Beckman JS, Estévez AG, Barbeito L (2004) Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry* 89:464-473.
- Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427-434.
- Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW (1995) Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 132:172-179.
- Pramatarova A, Laganieri J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA (2001) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 21:3369-3374.
- Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 33:1451-1464.
- Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, Wong LF, Bilsland LG, Greensmith L, Kingsman SM, Mitrophanous KA, Mazarakis ND, Azzouz M (2005) Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11:429-433.
- Renkawek K, Stege GJ, Bosman GJ (1999) Dementia, gliosis and expression of the small heat shock proteins hsp27 and alpha B-crystallin in Parkinson's disease. *Neuroreport* 10:2273-2276.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577.

- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62.
- Rothstein JD (1996) Excitotoxicity hypothesis. *Neurology* 47:S19-25; discussion S26.
- Rowland LP, Shneider NA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344:1688-1700.
- Saez ET, Pehar M, Vargas MR, Barbeito L, Maccioni RB (2006) Production of nerve growth factor by beta-amyloid-stimulated astrocytes induces p75NTR-dependent tau hyperphosphorylation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 84:1098-1106.
- Sasaki S, Iwata M (1996) Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 204:53-56.
- Schiffer D, Cordera S, Cavalla P, Migheli A (1996) Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 139 Suppl:27-33.
- Schwab C, McGeer PL (2008) Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis* 13:359-369.
- Seth P, Grant A, Tang J, Vinogradov E, Wang X, Lenkinski R, Sukhatme VP (2011) On-target inhibition of tumor fermentative glycolysis as visualized by hyperpolarized pyruvate. *Neoplasia* 13:60-71.
- Shefner JM et al. (2004) A clinical trial of creatine in ALS. *Neurology* 63:1656-1661.
- Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F, Appel SH (1996) Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39:203-216.
- Stacpoole PW (1989) The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism* 38:1124-1144.
- Stacpoole PW, Lorenz AC, Thomas RG, Harman EM (1988) Dichloroacetate in the treatment of lactic acidosis. *Annals of internal medicine* 108:58-63.
- Stacpoole PW, Kerr DS, Barnes C, Bunch ST, Carney PR, Fennell EM, Felitsyn NM, Gilmore RL, Greer M, Henderson GN, Hutson AD, Neiberger RE, O'Brien RG, Perkins LA, Quisling RG, Shroads AL, Shuster JJ, Silverstein JH, Theriaque DW, Valenstein E (2006) Controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of congenital lactic acidosis in children. *Pediatrics* 117:1519-1531.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC (2001) A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 276:38084-38089.
- Suzuki M, Tork C, Shelley B, McHugh J, Wallace K, Klein SM, Lindstrom MJ, Svendsen CN (2007) Sexual dimorphism in disease onset and progression of a rat model of ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 8:20-25.
- Trieu VN, Uckun FM (1999) Genistein is neuroprotective in murine models of familial amyotrophic lateral sclerosis and stroke. *Biochem Biophys Res Commun* 258:685-688.
- Vande Velde C, Dion PA, Rouleau GA (2011) Amyotrophic lateral sclerosis: new genes, new models, and new mechanisms. *F1000 Biology Reports* 3.
- Vargas MR (2005) Fibroblast Growth Factor-1 Induces Heme Oxygenase-1 via Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2) in Spinal Cord Astrocytes: CONSEQUENCES FOR MOTOR NEURON SURVIVAL. *Journal of Biological Chemistry* 280:25571-25579.
- Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Beckman JS, Barbeito L (2006) Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *J Neurochem* 97:687-696.
- Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A, Johnson JA (2008) Nrf2 Activation in Astrocytes Protects against Neurodegeneration in Mouse Models of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroscience* 28:13574-13581.
- Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Martinez-Palma L, Thompson JA, Beckman JS, Barbeito L (2005) Fibroblast growth factor-1 induces heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in spinal cord astrocytes: consequences for motor neuron survival. *J Biol Chem* 280:25571-25579.
- Vazquez MC, Ketzoian C, Legnani C, Rega I, Sanchez N, Perna A, Penela M, Aguirrezabal X, Druet-Cabanac M, Medici M (2008) Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in Uruguay: a population-based study. *Neuroepidemiology* 30:105-111.
- Veldink JH, Bar PR, Joosten EA, Otten M, Wokke JH, van den Berg LH (2003) Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscular disorders* : NMD 13:737-743.

- Verkhratsky A, Sofroniew MV, Messing A, deLanerolle NC, Rempe D, Rodriguez JJ, Nedergaard M (2012) Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. *ASN neuro* 4.
- Vijayvergiya C, Beal MF, Buck J, Manfredi G (2005) Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci* 25:2463-2470.
- Warburg O, Wind F, Negelein E (1927) The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* 8:519-530.
- Wilson JS, Rushing G, Johnson BL, Kline JA, Back MR, Bandyk DF (2003) Dichloroacetate increases skeletal muscle pyruvate dehydrogenase activity during acute limb ischemia. *Vasc Endovascular Surg* 37:191-195.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14:1105-1116.
- Wu AS, Kiaei M, Aguirre N, Crow JP, Calingasan NY, Browne SE, Beal MF (2003) Iron porphyrin treatment extends survival in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 85:142-150.
- Xu J-X (2004) Radical Metabolism Is Partner to Energy Metabolism in Mitochondria. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1011:57-60.
- Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, Cleveland DW, Goldstein LS (2008a) Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7594-7599.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008b) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11:251-253.
- Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD (2010) Decline in mitochondrial bioenergetics and shift to ketogenic profile in brain during reproductive senescence. *Biochimica et biophysica acta* 1800:1121-1126.
- Yao J, Irwin R, Chen S, Hamilton R, Cadenas E, Brinton RD (2012) Ovarian hormone loss induces bioenergetic deficits and mitochondrial beta-amyloid. *Neurobiol Aging* 33:1507-1521.
- Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, Friedlander RM (2002) Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417:74-78.