



Mecanismos de degeneración axonal en neuroinflamación: papel de la disfunción mitocondrial

Oihana Errea Lorenzo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Mecanismos de degeneración axonal en neuroinflamación: el papel de la disfunción mitocondrial

Memoria presentada por Oihana Errea Lorenzo para optar al grado de doctora
por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado: Biomedicina

Línea de Investigación: Neurociencias

Trabajo realizado en el Centro de Neuroinmunología del Instituto de
Investigaciones Biomédicas August Pi I Sunyer

Director de tesis:

Dr. Pablo Villoslada Díaz

Doctoranda:

Oihana Errea Lorenzo



I. AGRADECIMIENTOS

Parece mentira pero ha llegado este momento, estoy escribiendo los agradecimientos de mi tesis doctoral. Seguro que me dejaré a alguien en el tintero, pero voy a intentar acordarme de todos los que me habéis apoyado durante este proceso.

GRACIAS a los que habéis sido mi familia en los primeros tiempos en Barcelona. Lorea, Janire, María y Ion; sois los hermanos que biológicamente no tengo. Nunca olvidaré las risas, los retales y las cenas “light” en familia que me acompañaron al principio. Gracias también a Francesco por elegirme como la cantante de tu grupo, recuperaste mi faceta musical y me lo he pasado genial.

GRACIAS a mis niñas del máster. Núria, Úrsula y Núria, os habéis convertido en mis psicólogas semanales durante este proceso. Gracias por todas las cañitas que nos hemos tomado y que nos quedan por tomar.

GRACIAS a mis cuadrillas, en la distancia me habéis apoyado igual que si estuviera en Navarra. Gracias a mis chicas de Pamplona por vuestras llamadas, mails y reencuentros. Gracias a mi cuadrilla de Enériz, siempre os acordáis de mí para todos los eventos. Además, debo reconocer que nuestro grupo de whatsapp me ha subido el ánimo en más de una ocasión. Y por supuesto gracias a mi cuadrilla de la uni, sé que hagamos lo que hagamos y vayamos a donde vayamos, siempre nos seguiremos la pista.

GRACIAS a todos los compañeros y compañeras de laboratorio que he conocido a lo largo de estos años. Ali, Alice, Valeria, Sara, Ion (otra vez), Saida, Berta, Begoña, Eva, Laura, Raquel, etc., los ratos libres del laboratorio no hubieran sido lo mismo sin vosotros. Gracias Gemma por saber escucharme. Y muy especialmente, GRACIAS a Bea y Nagore. Bea, eres mi madre científica y vas a ser una gran madre para tu niñita y para todo aquel que caiga bajo tu tutoría. Y de ti Nagore, qué puedo decir de ti... Te has convertido en una gran

amiga y el día de tu cumpleaños de hace 4 años llenaste mi vida de felicidad. No me llega la vida entera para agradecértelo lo suficiente.

GRACIAS a Pablo y Alba, sin vosotros puede que hoy no estuviera escribiendo estas líneas. Me habéis descubierto el mundo de las mitocondrias y habéis sido un apoyo constante. No sé lo que nos deparará el futuro, pero espero que siempre mantengamos el contacto y prometo que cuando las mitocondrias vuelvan a mi vida, os llamaré para seguir colaborando.

GRACIAS a Alerie y Pancho. Mi estancia en Cambridge no hubiera sido lo mismo sin vosotros. Gracias por involucrarme tanto en vuestros proyectos y por, literalmente, haberme devuelto la pasión por la ciencia. Me llenasteis de fuerza para afrontar la recta final. Alerie, eres mi hermana, y nuestras vidas siempre estarán unidas.

GRACIAS a toda mi familia, sé que siempre estaréis ahí para mí. Os he echado mucho de menos y os seguiré echando de menos allí donde vaya. Y GRACIAS a mi familia política, la morriña ha sido mucho más fácil de llevar con vosotros al lado.

Finalmente, GRACIAS a mis padres, os quiero con locura, no hay mucho más que pueda decir. Y GRACIAS a ti Alberto, mi niño, por haberte convertido en mi compañero de vida, también te quiero con locura. El futuro da mucho menos miedo al compartirlo contigo. Definitivamente, sin vosotros tres hoy no estaría escribiendo estas líneas y por eso os dedico mi trabajo de tesis.

ESKERRIK ASKO

Oihana



II. ÍNDICE

I. Agradecimientos.....	3
II. Índice.....	7
III. Introducción.....	13
1. Esclerosis Múltiple: una enfermedad neuroinflamatoria y neurodegenerativa.....	15
2. Mecanismos de degeneración axonal en esclerosis múltiple.....	18
2.1. Mecanismos de daño axonal agudo	19
2.1.1. Evidencias de transección axonal en etapas tempranas de la enfermedad.....	19
2.1.2. Mecanismos de daño y degeneración axonal agudos en lesiones activas.....	21
2.2. Mecanismos de degeneración de axones crónicamente desmielinizados.....	22
2.2.1. Mecanismos de compensación del daño agudo	22
2.2.2. Mecanismos de degeneración axonal crónica....	23
3. Función mitocondrial en el sistema nervioso central.	25
3.1. La importancia de las mitocondrias en el SNC.....	25
3.2. El ciclo vital de las mitocondrias neuronales	27
3.3. Dinámica mitocondrial: procesos de fusión y fisión	28
3.4. Transporte axonal de mitocondrias	32
3.4.1. Citoesqueleto axonal.....	32
3.4.2. Proteínas motoras	34
3.4.3. Proteínas adaptadoras	34
3.4.4. Proteínas de anclaje....	35
3.4.5. Regulación del transporte mitocondrial axonal....	35
4. Implicaciones mitocondriales en la degeneración axonal en la esclerosis múltiple	37
4.1. Implicaciones mitocondriales durante el daño axonal agudo.....	37

4.2. Implicaciones mitocondriales durante la degeneración de axones crónicamente desmielinizados	39
5. Implicaciones mitocondriales en otras enfermedades neurodegenerativas	43
5.1. Mitocondrias y la enfermedad de Parkinson (EP)	43
5.2. Mitocondrias y la enfermedad de Alzheimer (EA).....	44
5.3. Mitocondrias y la enfermedad de Huntington (EH)	45
5.4. Mitocondrias en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)	46

IV. Hipótesis y Objetivos.....49

V. Material y Métodos.....53

1. Preparación de los cultivos organotípicos de cerebelo de ratón.....	55
2. Inmunofluorescencias y microscopía confocal	56
3. Western Blots	58
4. Medida de especies reactivas de oxígeno.....	60
5. Medida de citoquinas proinflamatorias.....	61
6. Ensayos de supervivencia celular (MTT)	62
7. Microscopía electrónica de transmisión para el estudio de la morfología mitocondrial	63
8. Obtención de las partículas lentivirales	65
9. Microinyección y grabación <i>in vivo</i> de los cultivos organotípicos para el estudio del transporte mitocondrial axonal	69
10. Valoración de la función mitocondrial mediante respirometría de alta resolución	70
11. Medida de la cantidad de ATP en los cultivos organotípicos.....	72
12. Análisis estadístico	73

VI. Resultados.....75

1. Caracterización del modelo de neuroinflamación in vitro: cultivos organotípicos de cerebelo de ratón estimulados con LPS77
 - 1.1. Desmielinización78
 - 1.2. Daño axonal81
 - 1.3. Estrés oxidativo.....83
 - 1.4. Citoquinas proinflamatorias85
 - 1.5. Punto temporal de referencia para los estímulos de LPS y H₂O₂ en el estudio de la biología mitocondrial86
2. Morfología mitocondrial axonal en neuroinflamación (LPS) y estrés oxidativo (H₂O₂).....88
 - 2.1. Método de segmentación para el análisis de las electromicrografías88
 - 2.2. Tamaño de las mitocondrias axonales91
 - 2.3. Forma de las mitocondrias axonales93
 - 2.4. Crestas mitocondriales95
3. Transporte mitocondrial axonal en neuroinflamación (LPS) y estrés oxidativo (H₂O₂).....97
 - 3.1. Comprobación de la infectividad del lentivirus en distintas líneas celulares97
 - 3.2. Supervivencia de los cultivos organotípicos microinyectados ...99
 - 3.3. Densidad mitocondrial axonal101
 - 3.4. Distribución de mitocondrias móviles y estacionarias102
 - 3.5. Comportamiento de las mitocondrias estacionarias.....103
 - 3.6. Comportamiento de las mitocondrias móviles104
4. Función mitocondrial de los cultivos organotípicos en neuroinflamación (LPS) y estrés oxidativo (H₂O₂)106
 - 4.1. Ensayos de respirometría106
 - 4.2. Cuantificación de complejos mitocondriales en los cultivos109

5. Cantidad de ATP producida por los cultivos organotípicos en neuroinflamación (LPS) y estrés oxidativo (H ₂ O ₂).....	111
6. Resumen de los resultados	112
VII. Discusión.....	115
1. Modelo de neuroinflamación en cultivos organotípicos de cerebelo murino	117
2. Respuesta de las mitocondrias axonales a la inflamación aguda y al estrés oxidativo	121
3. Respuesta de las mitocondrias del tejido a la inflamación aguda y al estrés oxidativo	126
4. Comparación de la respuesta mitocondrial en neuroinflamación y en estrés oxidativo	128
5. Limitaciones del estudio.....	131
VIII. Conclusiones.....	135
IX. Bibliografía.....	139
X. Abreviaturas y Fórmulas.....	159
XI. Anexos.....	167
1. Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokines Contribute to Demyelination and Axonal Damage in aCerebellar Culture Model of Neuroinflammation	169



III. INTRODUCCIÓN

1. Esclerosis Múltiple: una enfermedad neuroinflamatoria y neurodegenerativa.

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC). Afecta a unos 2,5 millones de personas en el mundo (Hauser y Oksenberg, 2006; Compston y Coles, 2008), siendo la causa más común de discapacidad neurológica entre adultos jóvenes. Los primeros síntomas suelen aparecer entre los 20 y los 40 años de edad, incluyendo alteraciones sensoriales, neuritis óptica y debilidad en las extremidades. Conforme la enfermedad progresa aparecen nuevos síntomas como la fatiga, la necesidad del uso de silla de ruedas, disfunción de la vejiga y deterioro cognitivo.

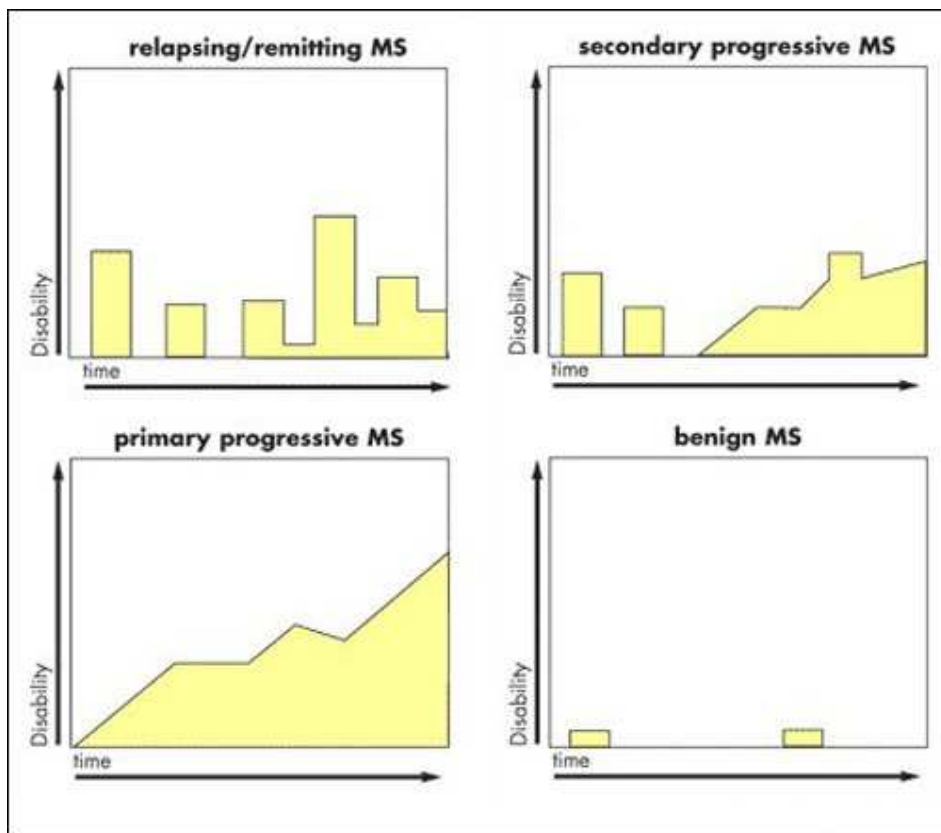
En función de la progresión de los síntomas clínicos pueden distinguirse distintos subtipos de EM (figura 1). Un 80% de los pacientes sufren períodos definidos de déficits neurológicos seguidos de períodos de recuperación (parcial), o EM remitente recurrente (EMRR) (Compston y Coles, 2008; Dutta y Trapp, 2011). En un 65% de los pacientes con EMRR, la enfermedad evoluciona a EM secundaria progresiva (EMSP) caracterizada por la acumulación gradual de déficits neurológicos. Por otro lado, aproximadamente un 20% de los pacientes desarrollan una enfermedad caracterizada por un continuo declive neurológico sin recuperaciones desde el comienzo de la misma, clasificada como EM primaria progresiva (EMPP).

Se sabe que factores tanto genéticos como ambientales contribuyen considerablemente a la susceptibilidad de padecer la enfermedad; sin embargo todavía se desconocen las causas iniciales. Los estudios genéticos recientes han conseguido identificar más de 100 polimorfismos asociados con la EM, principalmente genes que forman parte del complejo mayor de

histocompatibilidad de clase II, llamados HLA-DR15 y HLADQ6 (Hauser y Oksenberg, 2006; Beecham *et al.*, 2013). Y respecto a factores ambientales, se ha demostrado que fumar, los niveles de vitamina D e infecciones virales están directamente relacionados con la susceptibilidad de padecer la enfermedad (Marrie 2004; DeLorenze *et al.*, 2006), pero falta probar su papel patogénico.

Figura 1. Figura extraída de la página web <http://www.drugdevelopment-technology.com/projects/fingolimod/>

Principales formas de la EM en función del desarrollo de déficits neurológicos y discapacidad a lo largo del tiempo.



Histopatológicamente, se pueden observar en los cerebros y médula espinal de pacientes con EM lesiones focales (placas) desmielinizantes predominantemente en sustancia blanca, pero también en sustancia gris de ambas estructuras. Normalmente estas lesiones implican una ruptura de la barrera hematoencefálica, inflamación, desmielinización y pérdida de oligodendrocitos, gliosis y degeneración axonal (Dutta y Trapp, 2007; Trapp y Nave, 2008). La destrucción de la mielina y de los oligodendrocitos mediada por el sistema inmune se considera el primer evento patológico de la EM. Sin embargo, numerosos estudios demuestran que la principal causa de los déficits neurológicos de los pacientes es la pérdida axonal, bien aguda durante los brotes o bien progresiva a lo largo del transcurso de la enfermedad (Trapp *et al.*, 1998; Kuhlmann *et al.*, 2002; Filippi *et al.*, 2003; Bakshi *et al.*, 2008; Stadelmann *et al.*, 2008).

2. Mecanismos de degeneración axonal en esclerosis múltiple.

En los últimos años y gracias a diversos hallazgos, se ha vivido un cambio de enfoque respecto a la EM, considerada inicialmente como una enfermedad principalmente mediada por el sistema inmune. Actualmente, el daño y posterior degeneración axonal son considerados un evento temprano y persistente a lo largo de la progresión de la patología de la EM (Trapp et al., 1998; Trapp et al., 1999). Los mecanismos que provocan el daño axonal son muy diversos (mediadores inflamatorios, pérdida del soporte trófico que constituye la mielina, alteración de las concentraciones iónicas axonales, fallo energético, etc.) y evolucionan a lo largo de la enfermedad y de los distintos tipos de lesiones que aparecen en los pacientes.

Las lesiones que aparecen en la sustancia blanca se clasifican en función del grado de desmielinización y de inflamación (Van der Valk y De Groot, 2000). Así pues, lesiones con infiltrados de linfocitos y macrófagos, microglía activa y demielinización en curso se denominan “lesiones agudas activas”. Suelen estar acompañadas por un gran estrés oxidativo (Van Horssen *et al.*, 2008; Haider *et al.*, 2011). Estas lesiones evolucionan gradualmente hacia “lesiones crónicas activas” caracterizadas por poseer el centro completamente desmielinizado e inflamación en forma de macrófagos activados todavía en curso en los bordes. Cuando la inflamación desaparece, el área desmielinizada pasa a convertirse en una “lesión crónica inactiva”. Una proporción de las áreas desmielinizadas se remielinizan a lo largo de la enfermedad (placas fantasma), mientras que en las áreas no remielinizadas aparece una cicatriz gliótica. Las lesiones se encuentran rodeadas de tejido mielinizado conocido como “sustancia blanca de apariencia normal”, aunque esta acepción puede llevar a confusión ya que también se observa activación microglial y degeneración axonal en estas áreas (Ganter *et al.*, 1999; Bjartmar *et al.*, 2001).

Por lo anteriormente expuesto, es necesario diferenciar entre los mecanismos que median el daño axonal agudo y los mecanismos que subyacen a la degeneración axonal crónica.

2.1. Mecanismos de daño axonal agudo.

2.1.1. Evidencias de transección axonal en etapas tempranas de la enfermedad.

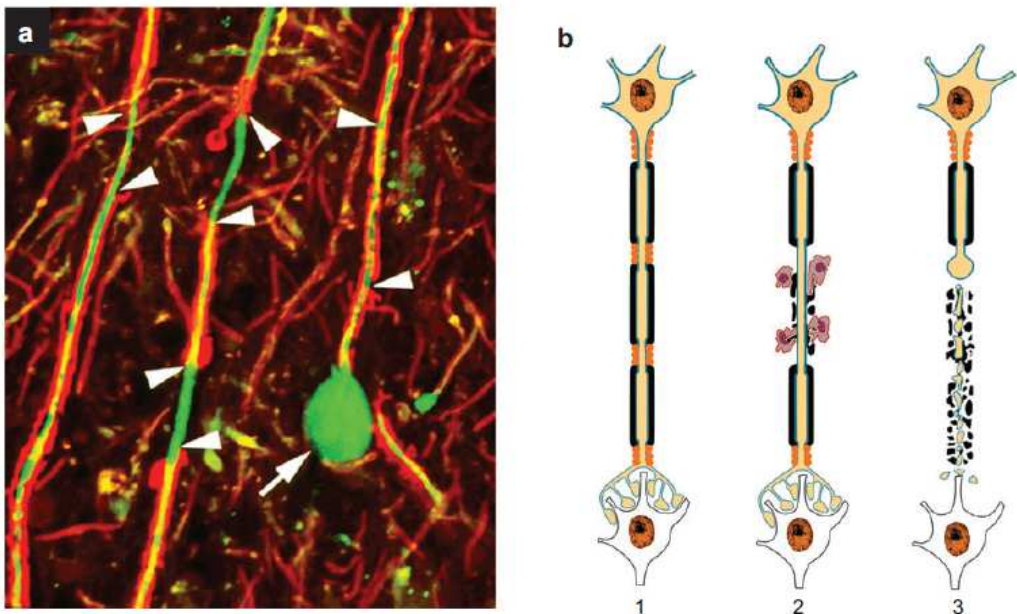
Existen numerosas evidencias de que el daño axonal aparece en estadios muy tempranos de la enfermedad. En diversos estudios se ha identificado el daño en axones desmielinizados mediante la detección de neurofilamentos no fosforilados (Trapp *et al.*, 1998), y de la acumulación de proteínas transportadas a través de los axones como la proteína precursora amiloide (APP, Ferguson *et al.*, 1997), subunidades formadoras de poro de canales de calcio tipo-N (Kornek *et al.*, 2001), y receptores metabotrópicos de glutamato (Geurts *et al.*, 2003).

La proteína APP normalmente se transporta muy rápidamente a través de los axones y sólo se detecta cuando el transporte axonal se ve interrumpido (Koo *et al.*, 1990). Se han descrito acumulaciones de APP en axones localizados en lesiones activas y en el borde de lesiones crónicas activas en pacientes de EM (Ferguson *et al.*, 1997). Algunas de las estructuras APP positivas eran terminales axonales abultados (bulbos axonales), es decir, axones transectados. Además, el número de bubos axonales APP positivos estaba correlacionado positivamente con el grado de inflamación de las lesiones.

La fosforilación de los neurofilamentos axonales incrementa la extensión de sus brazos laterales, incrementando el espacio entre filamentos y

en consecuencia el diámetro axonal (Sánchez *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2011). Se ha demostrado la presencia de neurofilamentos no-fosforilados en lesiones desmielinizadas activas en pacientes de EM, pertenecientes a estructuras ovoidales de terminales axonales transectados (figura 2). El número de axones transectados disminuía conforme se resolvía la inflamación en lesiones crónicas activas, lo que demostró una correlación positiva entre transección axonal y el grado de inflamación en las lesiones desmielinizadas de la sustancia blanca. Además, observaron la presencia de bulbos axonales en pacientes con una duración muy corta de la enfermedad, lo que demuestra que el daño axonal comienza en etapas muy tempranas de la EM (Trapp *et al.*, 1998).

Figura 2. Figura extraída de la publicación Trapp y Nave (2008) que muestra cómo se desarrolla la transección axonal durante la inflamación aguda. **a)** Imagen extraída de la publicación Trapp *et al.* (1998) de una lesión aguda activa (mielina en rojo, axones en verde). Se observan tres axones parcialmente desmielinizados (puntas de flecha) y un bulbo axonal (flecha). **b)** Esquema de la respuesta axonal durante la transección: axón mielinizado (1), células inmunes que desmielinizan el axón (2), axón transectado durante la desmielinización (3). La parte distal degenera rápidamente mientras que la parte conectada al soma sobrevive.



2.1.2. Mecanismos de daño y degeneración axonal agudos en lesiones activas.

Dado que la frecuencia de axones transectados en lesiones agudas se correlaciona positivamente con el grado de inflamación (Ferguson *et al.*, 1997; Trapp *et al.*, 1998) parece ser que el daño axonal en estadios tempranos de la enfermedad ocurre como consecuencia de la vulnerabilidad de los axones a la inflamación. Un microambiente inflamatorio contiene una amplia variedad de sustancias que pueden dañar a los axones, como enzimas proteolíticas, citoquinas, sustancias oxidativas y radicales libres producidos por células inmunes y gliales activadas (Hohlfeld 1997; Nave y Trapp 2008). La enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), una de la principales enzimas implicadas en la síntesis de óxido nítrico (NO), está sobre-expresada en lesiones inflamatorias agudas de EM (Bö *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2001; Smith y Lassmann, 2002). Niveles elevados de NO afectan a la supervivencia axonal modificando la acción de canales iónicos, transportadores y enzimas glicolíticas (McDonald y Moss, 1993; Renganathan *et al.*, 2002; Muriel *et al.*, 2003). El NO y su derivado, el peroxinitrito, también inhiben la respiración mitocondrial (Brown y Borutaite, 2002) limitando la capacidad de las mitocondrias axonales para generar ATP.

2.2. Mecanismos de degeneración de axones crónicamente desmielinizados.

2.2.1. Mecanismos de compensación del daño agudo.

A pesar de la pérdida axonal que se produce en etapas iniciales de la enfermedad, no aparecen grandes deficiencias asociadas en los pacientes durante los primeros estadios de EMRR. Esto se debe a la plasticidad del SNC que es capaz de activar numerosos mecanismos compensatorios de la pérdida y disfunción neuronal, tales como:

- La activación de áreas corticales que compensan la pérdida funcional causada por las lesiones (Reddy *et al.*, 2000; Rocca *et al.*, 2005; Buckle *et al.*, 2005; Pantano *et al.*, 2006).
- Neurogénesis en lesiones crónicas (Chang *et al.*, 2008).
- Remielinización (Franklin y Ffrench-Constant, 2008).
- Redistribución de canales de sodio en los axones desmielinizados (Waxman, 2006; Smith, 2007).
- Expresión de factores neurotróficos por células inmunes y por células del SNC (Stadelmann *et al.*, 2002; Martino, 2004; Villoslada y Genain, 2004; Nave y Trapp, 2008; Nave, 2010).

Sin embargo, la mayor parte de los pacientes con EMRR sufren un declive neurológico progresivo hacia EMSP en ausencia de tratamiento. Esta transición ocurre cuando se llega a un punto en el que el SNC no puede compensar la progresiva pérdida axonal y neuronal. Análisis *postmortem* de lesiones crónicas inactivas han revelado una extensa degeneración de axones crónicamente desmielinizados (Kornek *et al.*, 2000) y otros estudios estiman la pérdida axonal en médula espinal y *corpus callosum* en torno al 70% (Ganter *et al.*, 1999; Lovas *et al.*, 2000; Bjartmar *et al.*, 2000).

En etapas más tardías de la enfermedad esta degeneración se produce en ausencia de inflamación, por lo que los mecanismos subyacentes deben ser distintos a los implicados en la degeneración axonal durante la inflamación aguda.

2.2.2. Mecanismos de degeneración axonal crónica.

La degeneración de axones crónicamente desmielinizados se postula como consecuencia de un desequilibrio entre una excesiva demanda energética y un escaso suministro. En axones normalmente mielinizados, los canales de sodio (Na^+) se concentran en los nodos de Ranvier, permitiendo la conducción saltatoria del impulso nervioso. Cuando el Na^+ entra en el axoplasma de los nodos, la bomba sodio-potasio ATPasa (Na^+/K^+ ATPasa) lo intercambia rápidamente por K^+ extracelular, consumiendo una gran cantidad del ATP del SNC (Ames, 2000). Este intercambio iónico completamente dependiente del ATP disponible es necesario para mantener la polarización axonal y la repetitiva transmisión de potenciales de acción.

En los axones crónicamente desmielinizados, los canales de sodio se redistribuyen a lo largo de los mismos para intentar reestablecer la transmisión del impulso nervioso (Waxman, 2006). Esto implica un aumento considerable del consumo de ATP por parte de la bomba Na^+/K^+ ATPasa para extraer el Na^+ durante la repolarización del axolema. Llega un momento en el que la demanda energética excede la capacidad de las mitocondrias axonales para producir ATP, impidiendo el correcto funcionamiento de la bomba Na^+/K^+ ATPasa. Esto provoca el incremento de la concentración intra-axonal de Na^+ , que a su vez revierte el funcionamiento del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (que actúa sin consumir ATP) que comienza a extraer el exceso de Na^+ intra-axonal por Ca^{2+} extracelular (Stys *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2000). De esta forma, el Ca^{2+} se

acumula en el axoplasma y se inicia un ciclo vicioso de activación de enzimas degradativas, disfunción mitocondrial, reducida producción de ATP, paralización del transporte axonal y un aumento todavía mayor de la concentración de Ca^{2+} intra-axonal, con una consecuente activación de calpaínas que activan procesos de apoptosis, autofagia y probablemente de daño axonal.

3. Función mitocondrial en el sistema nervioso central.

3.1. La importancia de las mitocondrias en el SNC.

La mitocondria es un orgánulo citoplasmático cuya principal función consiste en llevar a cabo la respiración aerobia y la síntesis de ATP. Está constituida por una doble membrana y dividida en dos compartimentos: la matriz y el espacio intermembrana. La membrana mitocondrial externa contiene porinas que permiten la libre difusión de moléculas de hasta 5000 Da, y translocasas para el transporte de moléculas mayores. La membrana mitocondrial interna se invagina en la matriz formando las crestas mitocondriales. Contiene diversas proteínas incluyendo la cadena transportadora de electrones, la ATP sintasa, translocasas y el poro de permeabilidad transitoria (PTP). Los electrones derivados de la oxidación de diversos sustratos son transportados a través de la cadena transportadora de electrones (complejos I al IV, junto con la coenzima Q10 y el citocromo C), al mismo tiempo que los protones son bombeados al espacio intermembrana a través de los complejos I, III y IV. Este proceso redox genera un potencial de membrana que es utilizado por el complejo V o ATP sintasa para la síntesis de ATP. Ambos procesos juntos, el transporte de electrones y la síntesis de ATP, reciben el nombre de fosforilación oxidativa (OXPHOS).

La fosforilación oxidativa produce aproximadamente 15 veces más ATP desde la glucosa que la vía glucolítica. Por tanto, las células con una gran demanda metabólica como el tejido muscular, el hígado o el cerebro, son particularmente dependientes de la función mitocondrial. El cerebro humano consume en reposo un 20% de la energía metabólica corporal, constituyendo tan sólo un 2% de la masa corporal total (Silver y Erecinska, 1998). Las mitocondrias producen el 95% del ATP utilizado por el cerebro (Erecinska y Silver, 1994). La generación, procesamiento y transmisión de los impulsos

nerviosos dependen de los gradientes iónicos de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. De hecho, entre un 50% y un 60% del ATP cerebral se utiliza en mantener estos gradientes, especialmente a través de las bombas de Na^+/K^+ (Erecinska y Silver, 1994). Dentro de las neuronas, las mitocondrias se distribuyen a las regiones con una alta demanda energética como las sinapsis o los nodos de Ranvier (Berthold *et al.*, 1993; Rowland *et al.*, 2000; Bristow *et al.*, 2002).

Las mitocondrias son cruciales para la supervivencia de las células, no sólo por ser las principales generadoras de energía celular, sino también porque intervienen en la homeostasis iónica celular y en la regulación de la apoptosis. Juegan un importante papel en la regulación de la homeostasis del calcio intracelular (Werth y Thayer, 1994; Jouaville *et al.*, 1995; Budd y Nicholls, 1996; Babcock *et al.*, 1997). El calcio regula quinasas, fosfatasa, factores de transcripción, canales iónicos y sirve como mensajero intracelular para excitabilidad, exocitosis, tráfico de vesículas, proliferación celular, metabolismo y apoptosis (Carafoli *et al.*, 2001). Además, deshidrogenasas sensibles al Ca^{2+} pueden regular la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP en momentos de alta demanda energética (McCormack y Denton, 1980). Las mitocondrias regulan la concentración del calcio intracelular en asociación con el retículo endoplasmático y la membrana plasmática (Saris y Carafoli, 2005). A partir de una concentración intracelular de calcio entre 400-500 nM, las mitocondrias son capaces de almacenarlo de forma electroquímicamente favorable, gracias a su potencial de membrana negativamente cargado y unas bajas concentraciones de calcio en la matriz, introduciéndolo a través del transportador de Ca^{2+} . Este almacenamiento es reversible, ya que el calcio puede volver al citosol a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial

(Crompton *et al.*, 1978), prolongando la elevación de la concentración intracelular de calcio.

3.2. El ciclo vital de las mitocondrias neuronales.

Las mitocondrias neuronales tienen un tiempo de vida limitado (unos 24-30 días en ratas) pero su número y función se preservan a lo largo de la vida de una neurona sana (Chang y Reynolds, 2006). Esto implica varios procesos: la destrucción de mitocondrias dañadas no funcionales (mitofagia), la generación de nuevas mitocondrias (biogénesis) y procesos de fusión-fisión entre las mitocondrias ya existentes (dinámica mitocondrial). La coordinación entre todos estos procesos recibe el nombre de “control de calidad mitocondrial” (Fischer *et al.*, 2012).

Las mitocondrias dañadas, no funcionales y productoras de especies reactivas de oxígeno (ROS), son eliminadas mediante un tipo selectivo de autofagia denominado mitofagia. Consiste en la envoltura de la mitocondria dañada mediante un autofagosoma que posteriormente se fusiona a un lisosoma para la degradación proteolítica de la mitocondria. Normalmente los lisosomas se encuentran en el soma neuronal, por lo que la mitofagia requiere transporte retrógrado de las mitocondrias dañadas hacia el soma (Miller y Sheetz, 2004). Las principales proteínas implicadas en el proceso son PINK1 (una serin/treonin quinasa) y Parkin (E3 ubiquitin ligasa) (Narendra *et al.*, 2008). En mitocondrias sanas, PINK1 se transporta preferentemente hacia la membrana interna mitocondrial donde es secuestrada por PARL, y posteriormente degradada. Cuando una mitocondria está dañada, se disipa su potencial de membrana, lo que provoca que PINK1 se acumule en la membrana mitocondrial externa impidiendo su degradación a través de PARL (Jin *et al.*,

2010) y reclutando a Parkin hacia la mitocondria (Vives-Bauza *et al.*, 2010). Parkin poli-ubiquitina proteínas de la membrana mitocondrial externa como las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2) (Gegg *et al.*, 2010) que posteriormente son degradadas por la ATPasa p97 y el proteasoma (Tanaka *et al.*, 2010). La inhibición del proceso de fisión mitocondrial mediado por Drp1 paraliza la mitofagia (Tanaka *et al.*, 2010), demostrando que los procesos implicados en la dinámica mitocondrial (fusión y fisión) están íntimamente relacionados con la mitofagia.

La biogénesis de nuevas mitocondrias tiene lugar en el soma neuronal, cerca de la maquinaria de transcripción y traducción del ADN nuclear (Davis y Clayton, 1996), por lo que la maquinaria de transporte axonal anterógrado está involucrada en la correcta localización de las nuevas mitocondrias tras su formación. Uno de los principales reguladores de la biogénesis mitocondrial es el factor de transcripción PGC1 α (Austin y St-Pierre, 2012), además de regular también otros procesos metabólicos como la gluconeogénesis (Handschin y Spiegelman, 2006) y regular la expresión de numerosas enzimas neutralizadoras de especies reactivas de oxígeno (Austin y St-Pierre, 2012).

3.3. Dinámica mitocondrial: procesos de fusión y fisión.

Los procesos de fusión y fisión mitocondrial controlan la longitud, tamaño, forma y número de las mitocondrias, y también el correcto funcionamiento de las mismas. Normalmente, existe un balance entre ambos procesos que está regulado por diversas proteínas.

La **fusión** mitocondrial depende fundamentalmente de tres proteínas. Dos de ellas son las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2), GTPasas localizadas en la

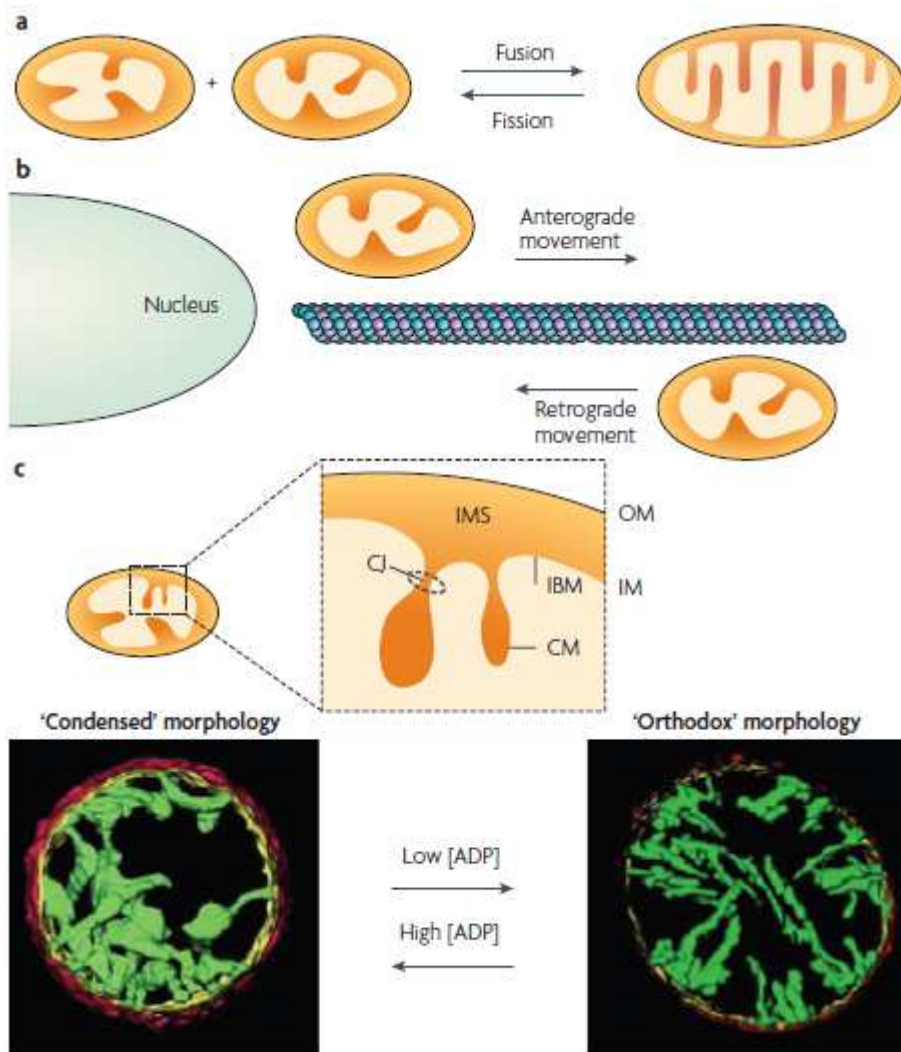
membrana externa mitocondrial (Chen *et al.*, 2003). La delección de una o ambas provoca la fragmentación de las mitocondrias celulares (Koshiba *et al.*, 2004). Las mitofusinas forman complejos homo-oligoméricos o hetero-oligoméricos en *trans* entre mitocondrias adyacentes para fusionarlas. La tercera proteína requerida para la fusión es OPA1 (Cipolat *et al.*, 2004). Se localiza en el espacio intermembrana, anclada a la membrana mitocondrial interna y es esencial para la organización y la fusión de las membranas internas (Olichon *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2003).

La proteína OPA1 tiene otra función importante, regular la estructura de las crestas mitocondriales. Se pueden distinguir tres zonas dentro de la membrana mitocondrial interna (figura 3c): la membrana de las crestas (CM), la membrana próxima a la membrana mitocondrial externa (IBM) y la zona de unión entre las dos (CJ). Esta distinción no sólo es morfológica, sino también funcional (Vogel *et al.*, 2006). Las zonas de la membrana interna que están más próximas a la membrana externa (IBM) contienen proteínas traslocadoras, como el complejo TIM23, para el transporte de otras proteínas. Las zonas de unión (CJ) son como cuellos estrechos, y están implicados en la liberación de determinadas proteínas del espacio intermembrana (IMS) durante la apoptosis, como el citocromo C (Scorrano *et al.*, 2002). Y la membrana de las crestas (CM) contiene todos los complejos mitocondriales implicados en la fosforilación oxidativa.

La estructura de las membranas mitocondriales está ligada al estado metabólico de la mitocondria (figura 3c). Mitocondrias purificadas colocadas en condiciones de baja concentración de ADP, tienen respiración limitada y una morfología “ortodoxa” caracterizada por crestas estrechas y pequeñas, y pocas uniones por cada compartimento de crestas. Cuando esas mismas mitocondrias se colocan en condiciones de alta concentración de ADP y sustratos, tienen alta

actividad respiratoria y una morfología “condensada” caracterizada por crestas más largas y muchas uniones por cada compartimento de crestas (Mannella, 2006). Por tanto, la morfología de la membrana mitocondrial interna y de las crestas mitocondriales está íntimamente relacionada con el estado bioenergético y respiratorio de la mitocondria.

Figura 3. Figura extraída del artículo Detmer y Chan, 2007. Muestra distintos procesos de la dinámica mitocondrial. **a)** Procesos de fusión u fisión mitocondrial. **b)** Transporte mitocondrial. **c)** Dinámica de la membrana mitocondrial interna.



La **fisión** mitocondrial requiere el reclutamiento de la proteína citosólica DRP1, que se ancla sobre la mitocondria formando anillos y espirales que la rodean y se estrechan. El reclutamiento de DRP1 a los sitios de fisión requiere la acción de las proteínas adaptadoras FIS1 y MFF. Ambas proteínas se encuentran en la membrana mitocondrial externa formando distintos complejos: MFF recluta DRP1 a la mitocondria, mientras que FIS1 modula el ensamblaje del aparato de fisión (Otera *et al.*, 2010). Diversas modificaciones postraduccionales (ubiquitinación, sumoilación y fosforilación) regulan la función de DRP1 y por tanto la fisión mitocondrial.

El balance entre fusión y fisión mitocondrial contribuye al control de calidad mitocondrial mencionado en el apartado anterior y tiene importantes consecuencias morfológicas y funcionales (Detmer y Chan, 2007). En primer lugar, los procesos de la dinámica mitocondrial controlan la forma, el tamaño, la longitud y el número de mitocondrias. En segundo lugar, estos procesos permiten el intercambio de componentes mitocondriales como complejos de la cadena respiratoria o ADN mitocondrial entre mitocondrias sanas y dañadas, lo que mantiene una población funcional de mitocondrias en la célula. En tercer lugar, la forma de las mitocondrias afecta a la posibilidad de transportarlas a localizaciones subcelulares específicas, siendo este punto especialmente importante en las neuronas ya que las mitocondrias deben ser transportadas a través de largas distancias. Y por último, la fisión mitocondrial facilita la apoptosis, ya que regula la liberación al citosol de determinadas proteínas del espacio intermembrana (Youle y Karbowski, 2005).

3.4. Transporte axonal de mitocondrias.

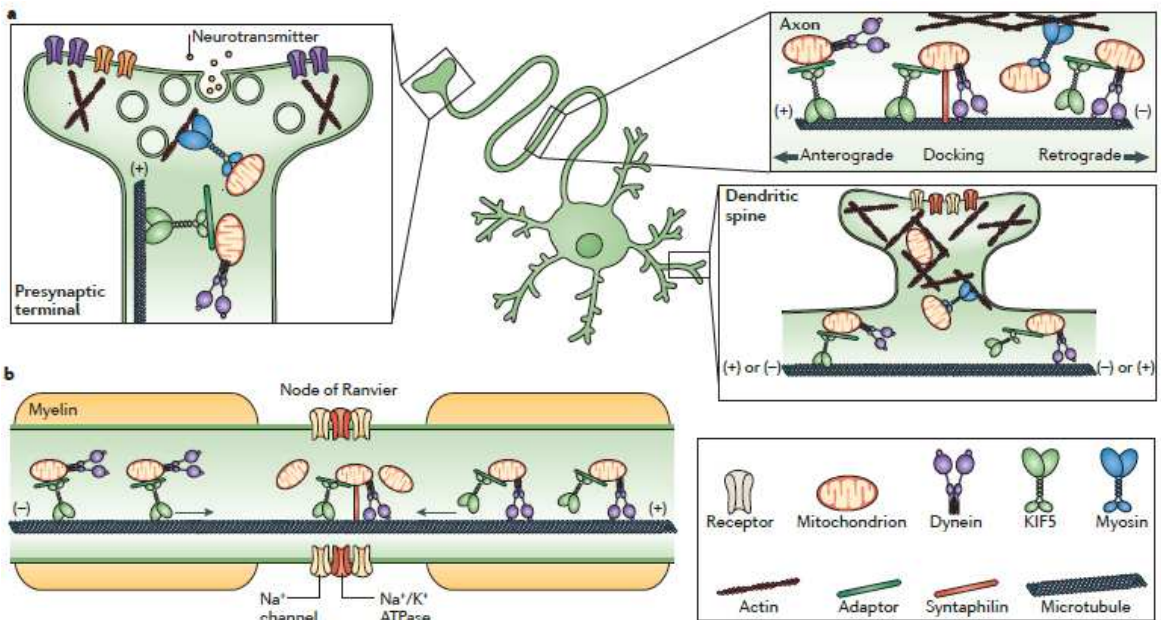
Las mitocondrias neuronales son transportadas desde el soma neuronal a lo largo de los microtúbulos mediante proteínas motoras hacia zonas de alta demanda energética o con necesidades de regulación de calcio como los nodos de Ranvier, ramas axonales, conos de crecimiento activos y las sinapsis (Morris y Hollenbeck, 1993; Mutsaers y Carroll, 1998; Ruthel y Hollenbeck, 2003; Zhang *et al.*, 2010). Normalmente, las proteínas motoras kinesinas se encargan del transporte anterógrado de las mitocondrias y las dineínas se encargan del transporte retrógrado. Sin embargo, las mitocondrias de forma individual, no suelen moverse en una única dirección a lo largo de los axones. Suelen hacer paradas de mayor o menor duración y cambios de sentido. Esto indica que toda la maquinaria de transporte (kinesinas, dineínas y la maquinaria de anclaje) se encuentra unida a cada mitocondria. Además de las proteínas motoras, también intervienen en el transporte axonal mitocondrial el citoesqueleto axonal y proteínas adaptadoras.

3.4.1. Citoesqueleto axonal.

Dos componentes del citoesqueleto neuronal entran en juego dentro del transporte mitocondrial: los microtúbulos y los filamentos de actina. Cada uno de ellos se encarga de un tipo de transporte diferente, sobre los microtúbulos se produce el transporte a largas distancias de los axones y sobre los filamentos de actina el transporte de corta distancia de los terminales sinápticos, espinas dendríticas y conos de crecimiento. Las proteínas motoras encargadas del transporte sobre los filamentos de actina son las miosinas (Langford, 2002), pero nos centraremos en describir la maquinaria encargada del transporte axonal.

Los microtúbulos axonales están organizados polarmente, los terminales positivos están dirigidos hacia la parte distal de los axones y los terminales negativos están dirigidos hacia el soma neuronal. Esta organización resulta crítica para el transporte dirigido de las mitocondrias, ya que las proteínas motoras kinesinas se dirigen hacia los terminales positivos (transporte anterógrado), mientras que las proteínas motoras dineínas se dirigen hacia los terminales negativos (transporte retrógrado) (figura 4).

Figura 4. Transporte mitocondrial en neuronas. Figura extraída del artículo Sheng y Cail, 2012. a) Distintos dominios funcionales y estructurales de la neurona. b) Movimiento mitocondrial axonal y acumulación en un nodo de Ranvier.



3.4.2. Proteínas motoras.

Las proteínas motoras encargadas del transporte mitocondrial axonal anterógrado son las kinesinas ATP-dependientes. Desde que la kinesina-1 (KIF5) fue descubierta, se han identificado al menos 45 genes humanos y murinos que codifican kinesinas (Hirokawa y Takemura, 2004). Los mamíferos poseen dos KIF5 específicas de las neuronas, KIF5A y KIF5C (Kanai *et al.*, 2000). El terminal amino de cada KIF5 contiene un dominio de unión a la proteína motora, mientras que el terminal carboxilo se une a las proteínas adaptadoras que cargan las mitocondrias a la proteína motora (Glater *et al.*, 2006).

Las dineínas son las proteínas transportadoras encargadas del transporte mitocondrial axonal retrógrado (Pilling *et al.*, 2006). La heterogeneidad en la familia de las dineínas es menor que la de la familia de las kinesinas, por lo que las proteínas adaptadoras juegan un papel esencial en la especificidad de la carga a transportar.

Kinesinas y dineínas se coordinan durante los complicados patrones de transporte de cada mitocondria. Se ha observado que las proteínas adaptadoras como dMiro en *Drosophila*, son fundamentales en la regulación de transporte anterógrado-retrógrado de las mitocondrias axonales (Russo *et al.*, 2009).

3.4.3. Proteínas adaptadoras.

Existen múltiples proteínas que sirven de adaptadoras entre las proteínas motoras y la carga, en este caso, las mitocondrias. El complejo más estudiado, sin duda, es el formado por dMiro y Milton en *Drosophila* para el acoplamiento a KIF5. dMiro es una proteína de la membrana mitocondrial externa que interacciona directamente con la proteína adaptadora Milton, la

cual a su vez posee dos dominios de unión a Ca^{2+} , que permiten la regulación del transporte mitocondrial en respuesta a los niveles de calcio intracelular (Fransson *et al.*, 2003). Los homólogos en mamíferos son Miro1 y Miro2 para dMiro, que forman complejos con los homólogos de Milton, TRAK1 y TRAK2 (Fransson *et al.*, 2003).

Se han identificado otras proteínas que también funcionan como adaptadoras en el transporte mitocondrial axonal. Una de ellas, la sintabulina, conecta KIF5 con vesículas que contienen sintaxina y poseen un dominio transmembrana carboxi-terminal que se une a las mitocondrias (Cai *et al.*, 2005). Otra de ellas es FEZ1, necesaria para el transporte mitocondrial axonal anterógrado en neuronas del hipocampo (Ikuta *et al.*, 2007).

3.4.4. Proteínas de anclaje.

Las proteínas de anclaje permiten la correcta distribución de las mitocondrias axonales en respuesta a las necesidades energéticas. La proteína específica que se encarga de esta función en las neuronas es la sintafilina. Su extremo carboxilo se une específicamente a las mitocondrias axonales, anclándolas a los microtúbulos y evitando su movimiento (Kang *et al.*, 2008).

3.4.5. Regulación del transporte mitocondrial axonal.

El ratio entre la población de mitocondrias móviles y la población de mitocondrias estacionarias es dinámico y responde fundamentalmente a dos estímulos: la disponibilidad de ATP y los niveles de calcio intracelular. Una disminución local de ATP por la aplicación de glutamato reduce la velocidad media de transporte mitocondrial (Mironov 2007), mientras que, una elevación de los niveles de ADP por un alto consumo de ATP recluta mitocondrias hacia las sinapsis (Mironov 2009). Por otro lado, el grado de reducción del transporte

mitocondrial se correlaciona con la duración de una concentración elevada de calcio intracelular (Mironov 2006).

El mecanismo de regulación del transporte mitocondrial axonal a través de los niveles de calcio intracelular se ha elucidado gracias al estudio del complejo formado por KIF5-Milton-Miro (Wang y Schwarz, 2009; Macaskill *et al.*, 2009). Se han propuesto dos modelos diferentes, pero en ambos Miro actúa como un sensor del calcio intracelular que paraliza el movimiento mitocondrial. El primer modelo propone que en ausencia de calcio, el extremo C-terminal de KIF5 se une a la mitocondria vía Milton-Miro y su extremo N-terminal se une a los microtúbulos. Sin embargo, cuando los niveles de calcio aumentan, éste se une a Miro provocando un cambio conformacional en KIF5 cuyo extremo N-terminal pasa a unirse a Miro (Wang y Schwarz, 2009). El segundo modelo propone que cuando los niveles de calcio aumentan y se ocupan los dominios de unión a calcio de Miro, se suelta la unión del extremo C-terminal de KIF5 al complejo formado por Milton-Miro y la mitocondria (Macaskill *et al.*, 2009).

4. Implicaciones mitocondriales en la degeneración axonal en la esclerosis múltiple.

En este capítulo se revisa cual es la implicación concreta de las mitocondrias axonales en los mecanismos de degeneración axonal de la esclerosis múltiple. Ya que en el capítulo 2 se ha hecho una distinción entre los mecanismos que dirigen el daño axonal agudo en las primeras etapas inflamatorias de la enfermedad, y los mecanismos que subyacen a la degeneración de los axones crónicamente desmielinizados en ausencia de inflamación en etapas más tardías de la enfermedad; dicha distinción se mantendrá a lo largo del presente capítulo.

4.1. Implicaciones mitocondriales durante el daño axonal agudo.

Como ya se ha dicho anteriormente, en las lesiones desmielinizadas inflamatorias de la sustancia blanca en fases agudas de la enfermedad, el alcance de la degeneración axonal se correlaciona con la severidad de la inflamación (Trapp *et al.*, 1998). En un subtipo de lesiones agudas, denominadas lesiones de patrón III o lesiones similares a hipoxia, se han observado defectos funcionales de la cadena respiratoria mitocondrial, concretamente del complejo IV, en axones, oligodendrocitos y astrocitos (Mahad *et al.*, 2008). En otro estudio en el que utilizaban el modelo animal de EM más utilizado, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), se detectó daño mitocondrial agudo dentro de axones que posteriormente sufrían degeneración focal, como paso patológico previo a los cambios morfológicos axonales (Nikic *et al.*, 2010). Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS), generadas por microglía y macrófagos activados son los culpables más probables de este daño axonal. De hecho, la eliminación de ROS revertía la

patología mitocondrial y rescataba a los axones de la degeneración en el modelo de EAE (Nikic *et al.*, 2010). En un tercer estudio, observaron la nitración de proteínas mitocondriales en axones todavía sanos de ratones con EAE, incluso antes de la infiltración de leucocitos (Qi *et al.*, 2006).

Durante un ataque inflamatorio agudo, las células T activadas inician una respuesta inflamatoria caracterizada por la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IFN- γ . Estas citoquinas estimulan la expresión de iNOS en microglía y macrófagos, produciéndose gran cantidad de NO (Bogdan, 2001). El complejo IV de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (o citocromo C oxidasa) posee un sitio de unión de O₂ (el aceptor final de la cadena) y cataliza la oxidación del citocromo C acoplada a la reducción del O₂ a H₂O. Cuando el NO está muy elevado, compete con el O₂ por su posición de unión en la citocromo C oxidasa, impidiendo la unión del mismo y bloqueando el flujo normal de electrones y la respiración mitocondrial (Cleeter *et al.*, 1994). En consecuencia, se paraliza el bombeo de protones al espacio intermembrana dificultando la síntesis de ATP.

Al mismo tiempo, la interrupción de la cadena transportadora de electrones provocada por la unión del NO al complejo IV incrementa la salida de electrones del sistema, aumentando los niveles de superóxido, una especie reactiva de oxígeno (Beckman y Koppenol, 1996). Normalmente, los niveles de superóxido están regulados por sistemas antioxidantes, que lo convierten en peróxido de hidrógeno y posteriormente éste en agua y oxígeno. El superóxido que escapa de esta regulación causa estrés oxidativo y puede combinarse con el NO para formar un especie más tóxica, el peroxinitrito, capaz de reaccionar e inactivar lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos (Beckman y Koppenol, 1996). Además, el peroxinitrito tiene un efecto directo en las mitocondrias provocando la peroxidación de sus lípidos de membrana, dañando los

complejos de la cadena transportadora de electrones y el ADN mitocondrial y provocando la apertura del poro de permeabilidad transitoria (PTP), liberándose citocromo C de la mitocondria, señal iniciadora de la cascada apoptótica.

Por último, los bajos niveles de ATP inhiben el transporte axonal, incluyendo el transporte de mitocondrias (Rintoul *et al.*, 2006). A su vez, la inflamación a través de moléculas como TNF- α y el estrés oxidativo a través del NO inhiben el transporte de mitocondrias y vesículas sinápticas mediante la activación de la c-Jun N-terminal kinasa (JNK) (Stagi *et al.*, 2006).

Por tanto, durante la inflamación aguda en las placas se producen un conjunto de mecanismos que pueden producir alteración de la función y biología mitocondrial, déficit energético y daño estructural y funcional de macromoléculas por el estrés oxidativo que pueden conducir al daño axonal agudo. En toda esta cascada, la mitocondria está en el centro. Por dicho motivo, conocer cómo las mitocondrias axonales se ven afectadas por la inflamación aguda permitirá conocer mejor los mecanismos implicados en la transección axonal aguda e identificar dianas terapéuticas para reducir el daño axonal durante los brotes de EM (neuroprotección).

4.2. Implicaciones mitocondriales durante la degeneración de axones crónicamente desmielinizados.

Muchos axones sobreviven a la desmielinización durante el ataque inflamatorio y se convierten en axones crónicamente desmielinizados. Ciertas observaciones indican que las mitocondrias axonales desarrollan mecanismos compensatorios a la falta prolongada de mielina. En axones desmielinizados de

lesiones crónicas inactivas de pacientes de EM se observó un aumento de la actividad del complejo IV mitocondrial y un aumento de la proteína de anclaje sintafilina (Mahad *et al.*, 2009). En otro estudio en el que utilizaban un modelo *in vitro* de desmielinización (co-cultivos de neuronas de la raíz del ganglio dorsal y células de Schwann tratados con lisolectina) observaron que la desmielinización provocaba un aumento de la velocidad de las mitocondrias móviles, tanto anterógradas como retrógradas (Kiryu-Seo *et al.*, 2010). En axones desmielinizados de lesiones crónicas, se observó un incremento del contenido mitocondrial axonal (Zambonin *et al.*, 2011).

Sin embargo, los axones de las lesiones crónicas de pacientes con EM van degenerando progresivamente. Como se mencionó en el apartado 2.2, en ausencia de mielina, se produce una redistribución de los canales de Na^+ para mantener la transmisión del impulso nervioso lo que incrementa mucho la demanda energética, creándose una situación de “hipoxia virtual” (Trapp y Stys, 2009). En un momento determinado, la demanda excede la capacidad de las mitocondrias axonales para producir ATP, lo cual acaba provocando un aumento de la concentración de Ca^{2+} intra-axonal (explicado en el apartado 2.2.2.). Cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta, las mitocondrias bombean parte de este calcio al interior de su matriz (Gunter y Sheu, 2009), y los prolongados niveles elevados de calcio intra-mitocondrial acaban provocando la apertura del poro PTP, la ruptura de la membrana externa mitocondrial y la salida de citocromo C al citosol desencadenando la cascada apoptótica.

¿Pero qué ocurre exactamente para que las mitocondrias axonales se vean sobrepasadas por la demanda energética axonal? Los axones acaban siendo incapaces de mantener la respuesta mitocondrial a la desmielinización como resultado de la incapacidad del soma neuronal para suministrar mitocondrias sanas. Un análisis *postmortem* por microarray de córtex motor

no-mielinizado procedente de pacientes con EM, reveló una disminución de la expresión de 26 subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial codificadas en el núcleo (Dutta *et al.*, 2006), que coincidía con una reducción de la actividad de los complejos I, III y IV. Las neuronas con respiración deficiente se encontraban en lesiones corticales y en sustancia gris de apariencia normal, y presentaban niveles elevados de deleciones en el ADN mitocondrial (lo cual también contribuye a la reducida actividad de los complejos mitocondriales ya que varias subunidades están codificadas en el ADN mitocondrial).

La expresión de los genes que codifican la cadena respiratoria mitocondrial está regulada por varios factores de transcripción. Entre todos ellos, uno de los más importantes es PGC1 α (Scarpulla, 2008). En sustancia gris de apariencia normal de pacientes con EMSP se observó un descenso significativo de PGC1 α , que se correlacionaba con la densidad neuronal local y resultaba en una expresión reducida de antioxidantes mitocondriales (Witte *et al.*, 2013). Por tanto, la expresión reducida de PGC1 α en neuronas induce disfunción mitocondrial por el descenso de la expresión de proteínas mitocondriales clave y aumenta la susceptibilidad mitocondrial al daño oxidativo.

Si a la incapacidad del soma neuronal para suministrar mitocondrias sanas al axón, le sumamos el daño sostenido durante el tiempo que sufren las mitocondrias axonales durante los ataques inflamatorios agudos a la sustancia blanca, el resultado final es que las mitocondrias axonales son incapaces de producir el ATP necesario para mantener la integridad y funcionalidad de los axones crónicamente desmielinizados.

Por tanto, en la fase progresiva de la EM se postula que los axones crónicamente desmielinizados sufren el fallo de la función mitocondrial y por

tanto déficit energético y mayor estrés oxidativo que podría conducir al daño axonal progresivo. De forma similar a la transección axonal aguda, conocer estos mecanismos permitiría identificar dianas terapéuticas para la EM progresiva.

5. Implicaciones mitocondriales en otras enfermedades neurodegenerativas.

Muchas enfermedades neurodegenerativas comparten ciertas características y mecanismos degenerativos como el estrés oxidativo o la activación microglial. Numerosos estudios apuntan a que un punto convergente en todas ellas puede ser la disfunción mitocondrial que produce daño axonal.

5.1. Mitocondrias y la enfermedad de Parkinson (EP).

Diversas observaciones sugieren que la disfunción mitocondrial está implicada en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y en la patogénesis de la EP. La *substantia nigra* de pacientes con EP muestra actividad reducida del complejo I mitocondrial, e inhibidores de este complejo como la rotenona, el MPTP o ciertos pesticidas causan cambios neurológicos similares a los de la EP (Schapira, 2008). Mutaciones puntuales y deleciones se acumulan en el ADN mitocondrial de neuronas en pacientes con EP (Kraytsberg *et al.*, 2006) y numerosos polimorfismos y haplotipos del ADN mitocondrial están asociados con el riesgo de padecer EP (Pyle *et al.*, 2005).

Estudios recientes revelan que la proteína α -sinucleína contiene una secuencia de unión a las mitocondrias, asociándose a su membrana interna e interfiriendo en la función del complejo I mitocondrial (Chinta *et al.*, 2012). En ratones transgénicos la sobreexpresión de α -sinucleína impide una correcta función mitocondrial, aumenta el estrés oxidativo y aumenta la patología de la *substantia nigra* inducida por MPTP (Song *et al.*, 2004).

Por otro lado, muchos genes asociados con formas hereditarias de la enfermedad codifican proteínas relacionadas con la función mitocondrial. Una de ellas es la proteína Parkin, asociada a la membrana mitocondrial externa e implicada en la prevención de la muerte celular por liberación de citocromo C y activación de caspasas y en la mitofagia de mitocondrias dañadas. La deficiencia de Parkin causa estrés oxidativo y daño mitocondrial, como se demostró en leucocitos de pacientes con mutaciones en Parkin que mostraban déficit de la actividad del complejo I (Müftüoğlu *et al.*, 2004). Otra de estas proteínas es PINK1, una kinasa mitocondrial también implicada en la mitofagia y el control de la muerte celular. Deficiencias en PINK1 causan un descenso de la actividad del complejo I y alteran la función sináptica de neuronas en *Drosophila* (Morais *et al.*, 2009). PINK1 y Parkin actúan sobre las mismas funciones mitocondriales, probablemente regulando el balance entre fusión y fisión mitocondrial (Deng *et al.*, 2008).

5.2. Mitocondrias y la enfermedad de Alzheimer (EA).

Numerosas evidencias sugieren que la disfunción mitocondrial ligada al estrés oxidativo tiene un papel importante en la patogénesis de la EA. En cerebros de pacientes con EA y modelos de ratones transgénicos, la proteína β -amiloide (β A) interacciona con una proteína alcohol deshidrogenasa de la matriz mitocondrial (ABAD), causando daño oxidativo de las mitocondrias e inhibición de la actividad de la cadena respiratoria (Manczak *et al.*, 2006). La proteína β A también interacciona con HtrA2/omi, una serin-proteasa proapoptótica liberada al citoplasma por las mitocondrias durante estimulación apoptótica (Lindholm *et al.*, 2004) y reduce la actividad de la citocromo C oxidasa en el cerebro y otros tejidos de pacientes (Casley *et al.*, 2002). La

reducción de la energía celular debida a la inhibición de los complejos I y IV promueve la fosforilación de Tau, sugiriendo que el daño mitocondrial puede estar implicado en la formación de ovillos neurofibrilares (Melov et al., 2007).

Por otro lado, también se ha sugerido que β A puede modular proteínas implicadas en los procesos de fusión y fisión mitocondrial. En hipocampo de pacientes con EA se han observado niveles reducidos de Drp1, OPA1, Mfn1, Mfn2 y niveles elevados de FIS1, sugiriendo una alteración de la dinámica mitocondrial en favor de la fisión. Además, en neuronas de hipocampo que sobreexpresan APP, las mitocondrias se acumulan en el área perinuclear, sugiriendo que β A puede impedir el transporte mitocondrial contribuyendo a la disfunción sináptica (Wang *et al.*, 2009).

5.3. Mitocondrias y la enfermedad de Huntington (EH).

La enfermedad de Huntington es una enfermedad autosómica dominante causada por la expansión de la repetición del trinucleótido CAG en el gen de la huntingtina (HTT). Repeticiones mayores de 40 están asociadas con el comienzo de la enfermedad. La HTT mutante puede causar disfunción mitocondrial por una interacción directa con el orgánulo, modulando su respiración, su potencial de membrana y su capacidad de almacenar calcio (Bossy-Wetzel et al., 2008). La actividad respiratoria de la cadena mitocondrial, concretamente la del complejo II, está reducida en cerebros con EH (Kwong *et al.*, 2006). El inhibidor del complejo II, ácido 3-nitropropiónico, induce degeneración estriatal y desórdenes del movimiento parecidos a los de la enfermedad de Huntington en roedores y primates (Bossy-Wetzel et al., 2008), mientras que la sobreexpresión de subunidades del complejo II restaura la actividad del complejo y reduce la muerte celular en neuronas estriatales que

expresan la HTT mutante (Reddy et al., 2009). La HTT se asocia con la membrana mitocondrial externa y la HTT mutante incrementa la sensibilidad mitocondrial a la permeabilización mediada por calcio y la liberación de citocromo C (Lin y Beal, 2006).

Estudios recientes sugieren que alteraciones en la dinámica mitocondrial pueden estar implicadas en la patogénesis de la EH. La HTT regula los complejos de la fusión y fisión mitocondrial y la HTT mutante puede alterar el ensamblaje y la función de estos complejos, lo que causaría un fallo energético y la posterior muerte celular (Bossy-Wetzl et al., 2008).

5.4. Mitocondrias en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

Aproximadamente un 10% de los casos de ELA tipo 1 son hereditarios y alrededor del 20% de las formas mendelianas están causadas por mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa tipo 1 (SOD1) (Rosen *et al.*, 1993). Muestras postmortem y procedentes de biopsias de pacientes con ELA muestran disminución de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial; y la sobreexpresión de SOD1 mutante en ratones transgénicos causa disfunción de la cadena mitocondrial, una capacidad disminuida de almacenamiento de calcio por parte de las mitocondrias y una producción aberrante de ROS (Lin y Beal, 2006). Varios estudios han demostrado que SOD1 y su forma mutante se localizan en mitocondrias en los tejidos afectados (Vijayvergiya *et al.*, 2005). Agregados de SOD1 en la membrana mitocondrial externa bloquean la importación de proteínas y promueven la producción aberrante de ROS con el consecuente daño oxidativo a las proteínas y los lípidos mitocondriales (Mattiuzzi *et al.*, 2002). Estos agregados pueden contribuir a la muerte celular por apoptosis mediante la

liberación de citocromo C (Takeuchi *et al.*, 2002) y el secuestro de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Pasinelli *et al.*, 2004).



IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La Esclerosis Múltiple afecta preferentemente a la conectividad cerebral lesionando los axones de forma irreversible, siendo esta lesión la principal causa de la discapacidad permanente de los pacientes. El daño axonal se produce de forma aguda debido a la cascada inflamatoria y de forma crónica (degenerativa) debido a la falta de soporte trófico de la mielina, un microambiente alterado (gliótico) y persistencia de inflamación crónica (activación microglial). Los axones son dañados en la fase aguda por el estrés oxidativo y energético y mecanismos de citotoxicidad, produciéndose un fallo del transporte axonal y un fallo de la función mitocondrial. Todos estos procesos culminan en el déficit energético, que pone en marcha mecanismos activos de transección axonal que llevan a la lesión axonal aguda. Los mecanismos de daño axonal crónico serían en parte similares a los agudos (déficit energético) extendidos en el tiempo, junto con el fallo de soporte trófico de la mielina, la modificación de la función y distribución de los canales iónicos y la consecuente alteración del microambiente.

Identificar los mecanismos y la dinámica del daño axonal agudo y crónico en la EM permitirá identificar dianas terapéuticas para las que se desarrollarían nuevas terapias neuroprotectoras que disminuirían el daño axonal en la EM y por tanto las secuelas.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo del proyecto es analizar distintos aspectos de la biología mitocondrial y de su función respiratoria y energética relacionados con la

degeneración axonal en un entorno neuroinflamatorio. Para conseguirlo se ha utilizado un modelo de neuroinflamación *in vitro* consistente en cultivos organotípicos de cerebelo de ratón estimulados con lipopolisacárido bacteriano (LPS) y los cambios se han evaluado mediante técnicas de microscopía avanzada y biología molecular.

A lo largo del estudio de la biología mitocondrial también se ha utilizado un estímulo causante de estrés oxidativo, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), proceso que forma parte de la neuroinflamación y afecta directamente a la función de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Objetivos específicos

1. Caracterización del daño axonal en el modelo de neuroinflamación *in vitro* que se va a utilizar para el estudio de la biología mitocondrial (estado de la mielina, cuantificación de citoquinas proinflamatorias y de especies reactivas de oxígeno, y daño axonal).
2. Análisis de los cambios morfológicos (forma, tamaño y número de crestas) de las mitocondrias axonales durante la neuroinflamación y el estrés oxidativo.
3. Estudio del transporte mitocondrial axonal durante la neuroinflamación y el estrés oxidativo.
4. Cuantificación de la densidad mitocondrial intra-axonal en ambas situaciones.
5. Análisis de la función respiratoria de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en presencia de inflamación y estrés oxidativo.
6. Cuantificación de los cambios en la producción de ATP en el tejido en respuesta a la neuroinflamación y al estrés oxidativo.



V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Preparación de los cultivos organotípicos de cerebelo de ratón.

Los cerebelos extraídos de ratones C57BL/6J (Harlan Laboratories o Janvier Labs) de 7 días de edad se cortaron siguiendo el plano sagital mediante el cortador de tejido McIlwain Tissue Chopper (Mickle Laboratory) obteniéndose cortes de 300µm. Estos cortes se colocaron sobre filtros de 0'4µm (Cell Culture Inserts, Millipore) los cuales a su vez se introducen en placas de 6 pocillos (Nunc) con 1ml de medio de cultivo (50% BME, 25% HBSS, 25% HS, 5 mg/ml glucosa, 0'25mM L-glutamina, 25 µg/ml penicilina-estreptomicina, 1x antimicótico). Los cultivos organotípicos se incubaron a 37°C, 5% CO₂ y el medio se renovó cada 2-3 días a lo largo del procedimiento. En todos los experimentos antes de comenzar los estudios, los cortes de cerebelo se mantuvieron 7 días en cultivo para reducir la activación microglial y permitir la mielinización de los axones.

Las estimulaciones se realizaron tras el período de estabilización añadiendo lipopolisacárido de *E.Coli* (LPS, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 15 µg/ml o peróxido de hidrógeno (H₂O₂, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 500 µM, durante 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Todas las muestras, incluyendo los controles negativos no estimulados, se recogieron tras 11 días *in vitro* (DIV), excepto en los experimentos en los que los estímulos se mantuvieron sólo durante 24 horas que se recogieron tras 8 DIV.

2. Inmunofluorescencias y microscopía confocal.

Tras las correspondientes estimulaciones, los cultivos se fijaron durante 40 minutos con 4% paraformaldehído en 0'1M PB, y se despegaron del filtro con un pincel. Si no se continúa de forma inmediata con la inmunofluorescencia, las secciones pueden almacenarse en PBS 1x a -20°C. Para bloquear la unión de sitios inespecíficos los cortes se incubaron durante 1h a temperatura ambiente en una solución de bloqueo que contiene 0'5% Tritón (Sigma-Aldrich) y 10% de suero (correspondiente a la especie en que se haya obtenido el anticuerpo secundario que se vaya a utilizar) en PBS 1x. La incubación con el anticuerpo primario adecuado diluido en solución de bloqueo (Tabla 1) se realizó durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con 0'1% Tritón en PBS 1x y la incubación con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo (Tabla 1) durante 2h a temperatura ambiente. Finalmente, tras 3 lavados con 0'1% Tritón en PBS 1x y un lavado en PBS 1x (de 10 minutos cada uno), los cortes se montaron utilizando Vectashield mounting medium con DAPI (Vector Laboratories). Las imágenes fueron capturadas mediante un microscopio confocal invertido SP5 (Leica Microsystems). Para el análisis de las imágenes obtenidas se utilizó el software libre ImageJ.

Tabla 1. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para las inmunofluorescencias.

Anticuerpo primario	Dilución primario	Suero (solución de bloqueo)	Anticuerpo secundario	Dilución secundario
Monoclonal rat anti-MBP (AbD serotec)	1:200	Goat Serum (Vector Laboratories)	Goat anti-rat IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)	1:500
Monoclonal rabbit anti-NF-L, (Cell Signaling)	1:200	Goat Serum	Goat anti-rabbit IgG Cy3-linked (GE Healthcare)	1:500
Polyclonal rabbit anti-Iba1 (Wako)	1:400	Goat Serum	Goat anti-rabbit IgG Cy3-linked	1:500
Purified mouse anti-iNOS (BD Bioscience)	1:200	Goat Serum	Goat anti-mouse IgG Cy2-linked (GE Healthcare)	1:500
Polyclonal rabbit anti-NF-H (Abcam)	1:200	Goat Serum	Goat anti-rabbit IgG Cy3-linked	1:500
Monoclonal mouse anti-NF-H non-phosphorylated (SMI32) (Covance)	1:200	Goat Serum	Goat anti-mouse IgG Cy2-linked	1:500

3. Western Blots.

Se utilizaron dos protocolos distintos para la detección de cuatro proteínas. El primer protocolo se utilizó para la detección de CNPase e iNOS y el segundo para la detección de los complejos mitocondriales II (SUO) y IV (COX IV). En ambos casos, se colocaron cuatro cortes de cerebelo por cada pocillo y tras las correspondientes estimulaciones se recogieron en 100ul de RIPA buffer (Sigma) al que previamente se le añadió un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma). Posteriormente, las muestras se homogeneizaron mediante un sonicador para Eppendorfs, se centrifugaron durante 5 minutos a 12000 rpm y 4°C, y se recolectaron los sobrenadantes. Para cuantificar la cantidad de proteínas totales se utilizó el método de Bradford (Sigma) (Bradford, 1976).

Para la detección de las proteínas CNPase e iNOS se cargaron 10 µg de proteína total y se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la cual se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con TBS + 0,05% Tween + 3% BSA. Los anticuerpos primarios se diluyeron en buffer de bloqueo: mouse anti-CNPase 1:500 (Abcam), mouse anti-iNOS 1:200 (BD Bioscience); y se incubaron durante la noche a 4°C. Para la detección final, se utilizó el anticuerpo HRP-conjugated anti-mouse IgG (Cell Signaling) a una dilución 1:2000 en buffer de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. El control de carga de las proteínas y la normalización de los resultados se realizó mediante la tinción Ponceau S.

Para la detección de las proteínas SUO y COX IV se cargaron 40 µg de proteína total en geles comerciales 4-12% Criterion XT Bis-Tris (Bio-Rad) y para la electroforesis se utilizó el buffer MES (Bio-Rad) adecuado para la separación de proteínas de bajo peso molecular. La transferencia se realizó a membranas de PVDF (GE Healthcare) previamente activadas con 100% metanol durante 1

minuto. Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con TBS + 0,05% Tween + 5% leche en polvo. Los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo se incubaron durante la noche a 4°C (mouse anti-SUO, 1:1000, Molecular Probes; mouse anti-COX IV, 1:1000, Molecular Probes). Al día siguiente, tras varios lavados con TBS-Tween 0,05%, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario HRP-conjugated anti-mouse IgG (GE Healthcare) diluido en la solución de bloqueo (1:10000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para el control de carga de las proteínas y la normalización de los resultados, tras un paso de *stripping* y un nuevo bloqueo, las membranas se incubaron con un anticuerpo HRP-conjugated anti- β Actin (Sigma) diluido en solución de bloqueo 1:25000, durante 20 minutos a temperatura ambiente.

4. Medida de especies reactivas de oxígeno.

Una hora antes de finalizar las estimulaciones con LPS se añadió al medio de cultivo el reactivo CM-H₂DCFDA (Molecular Probes) a una concentración final 50µM (cada vial se reconstituyó con DMSO a una concentración stock 5mM). La incubación de 1h se realizó a 37°C, 5% CO₂. Tras un lavado con PBS 1x para retirar el exceso de reactivo no incorporado por las células, los cortes se recogieron en una placa de 96 pocillos negra (Nunc) cortando el filtro alrededor de los mismos con un bisturí y dicha placa se leyó inmediatamente en el espectrofluorímetro (FLx800, BioTek Instruments) ($\lambda_{excitación} = 485nm$, $\lambda_{emisión} = 528nm$).

5. Medida de citoquinas proinflamatorias.

Tras las correspondientes estimulaciones, durante distintos períodos de tiempo, se recogió el medio de cultivo para cuantificar la cantidad de citoquinas proinflamatorias secretadas (IL-1 β , TNF- α , IL-6). Para ello, se utilizaron kits comerciales de ELISA (eBioscience) y se siguieron los protocolos establecidos por el fabricante. Finalmente, las placas se leyeron en el espectrofotómetro (FLx800, BioTek Instruments) a 450nm.

6. Ensayos de supervivencia celular (MTT).

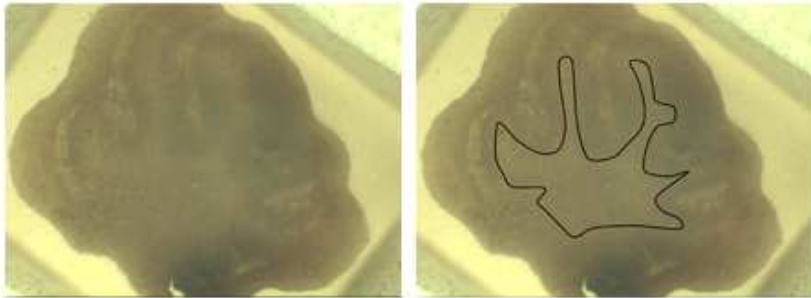
Para comprobar la supervivencia de los cultivos organotípicos se utilizó el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma) que disuelto en agua da lugar a una disolución amarillenta. Las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas convierten la solución amarillenta de MTT en un precipitado de color azul (MTT-formazan) que puede cuantificarse por colorimetría mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570nm.

Al final de las correspondientes estimulaciones, se añadió el MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubaron los cultivos 3 horas a 37°C. Posteriormente, se recogió el tejido de cada pocillo en 200 µl de 0,1M HCl en 2-Propanol y se incubaron 25 minutos a temperatura ambiente. La solución ácida disuelve el tejido y permite que el precipitado azul pase del tejido a la disolución. Tras una centrifugación de 3 minutos a velocidad máxima, se leyeron los sobrenadantes en una placa de 96 pocillos (Nunc) a 570nm. Como control positivo de muerte celular se incubaron cultivos organotípicos de cerebelo de ratón con sulfato de cobre (CuSO₄) 150 µM durante 24 horas.

7. Microscopía electrónica de transmisión para el estudio de la morfología mitocondrial.

Para estudiar la morfología de las mitocondrias axonales, se fijaron y trataron cultivos organotípicos para microscopía electrónica de transmisión. Los cortes se fijaron en 2% paraformaldehído y 2'5% glutaraldehído en PB 0'1M durante 24h a 4°C. Tras un lavado de 12h con PB 0'1M (varios cambios de buffer), se realizó una postfijación con 2% tetróxido de osmio en PB 0'1M durante 1h a 4°C. Posteriormente, se procedió a la deshidratación del tejido mediante disoluciones de metanol de concentraciones crecientes y a su inclusión en resina Epon mediante una técnica de inclusión plana para conseguir cortes longitudinales de los axones, siguiendo el plano sagital de corte del cultivo organotípico. Se seleccionaron únicamente áreas de sustancia blanca para la ultramicrotomía (Figura 5). Finalmente, las secciones se contrastaron mediante acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras fueron observadas mediante un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010 e imágenes de mitocondrias axonales fueron adquiridas con una cámara Megaview III incorporada al microscopio. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el software libre ImageJ.

Figura 5. Imagen de un cultivo organotípico incluido en un bloque de resina y de la zona de sustancia blanca seleccionada para la obtención de cortes ultrafinos.



Se diluyeron los 2 μg del plásmido en 500ul de TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA). Para aumentar la cantidad de plásmido, se transformaron *E. Coli* competentes DH5 α (Invitrogen) junto con el plásmido control pUC19 (ampicilina resistente) para verificar la eficiencia de la transformación, y se sembraron en placas de LB agar con X-gal (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Tras una incubación durante la noche a 37°C, la selección de colonias transformadas se realizó gracias al sistema proporcionado por el gen que codifica la enzima β -galactosidasa, que en bacterias transformadas se ve interrumpido, de forma que esas células no son capaces de procesar el X-gal, y poseen una coloración blanca. Las colonias no transformadas procesan el X-gal y se tiñen de azul.

Con las colonias seleccionadas, se realizó una validación de clones previa a la multiplicación en grandes volúmenes de las bacterias transformadas. Para ello, se inocularon las colonias seleccionadas en 3 ml de LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se cultivaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se recolectaron las bacterias mediante una centrifugación de 15 minutos a 6000g y 4°C, y se extrajo el ADN de los plásmidos mediante un kit comercial (QIAGEN Plasmid Mini kit) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Se cuantificó la cantidad de ADN de cada muestra mediante un NanoDrop (Thermo Scientific) y se realizó un análisis de restricción mediante la enzima Not I (New England BioLabs) que producía un fragmento de ADN de 7753 pares de bases, lo cual se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Con los ADN plasmídicos validados se volvieron a transformar *E. Coli* competentes DH5 α siguiendo el protocolo antes descrito. Las colonias seleccionadas se inocularon en 25 ml de LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y tras cultivarlas durante la noche a 37°C, al día siguiente se extrajo el ADN de los

plásmidos mediante el kit comercial QIAGEN Plasmid Midi kit. Para asegurar la presencia del plásmido se volvió a realizar el análisis de restricción.

Una vez obtenido el plásmido, se procedió a la producción de las partículas lentivirales completas mediante la transfección de la línea celular 293FT (Invitrogen) siguiendo el protocolo de expresión lentiviral ViraPower de Invitrogen. Se realizaron 3 pases de las células 293FT tras su descongelación, cada dos días (medio de cultivo: 90% DMEM, 10% FBS, 0,1mM MEM NEAA, 6mM L-glutamina, 1mM MEM Sodium Pyruvate, 500 µg/mL Geneticina). El día anterior a la transfección se sembraron las células en placas de Petri de 10 cm de diámetro y se cambiaron a medio sin antibióticos. Las células fueron transfectadas con el plásmido pLenti-MitoDsRed2 y la mezcla de plásmidos necesarios para que se formen las partículas virales completas (ViraPower Packaging Mix, Invitrogen) mediante el reactivo Lipofectamine (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. 48h horas después se recogieron los sobrenadantes de los cultivos, se centrifugaron 15 minutos a 3000g y 4°C y se filtraron (filtros de PVDF de 0,45 µm de poro, Millipore) para retirar el pellet de restos celulares. Posteriormente, los sobrenadantes se ultracentrifugaron a 110000g 3 horas a 4°C para concentrar las partículas virales que se resuspendieron en 1/100 volúmenes de PBS, se alicuotaron y se guardaron a -80°C.

Para comprobar que efectivamente el lentivirus final sólo infecta neuronas y no células gliales, se transfectaron las líneas celulares disponibles en el laboratorio siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (ViraPower Lentiviral Expression System, Invitrogen):

- PC12: células derivadas de feocromocitoma de médula adrenal de rata, cuyo origen embrionario se sitúa en la cresta neural, y si se tratan con

- NGF emiten neuritas y se diferencian a células similares a neuronas (medio: Ham's F12, 0,5% FBS, 1% Penicilina-Estreptomicina, 100 ng/mL NGF).
- BV2: células derivadas de microglía de ratón (medio: RPMI 1640, 10% FBS, 1% Penicilina-Estreptomicina).
 - NSC34: línea celular derivada de la hibridación de motoneuronas de ratón con neuroblastoma de ratón (medio: D-MEM, 10% FBS, 1% Penicilina-Estreptomicina, 2mM L-glutamina).
 - RN22: células derivadas de Schwannoma de rata (D-MEM, 10% FBS, 1% Penicilina-Estreptomicina, 2mM L-glutamina).

Las células NSC34 también se utilizaron para la titulación de las partículas virales. Sólo se utilizaron para la microinyección de los cultivos organotípicos las soluciones que contuvieran más de 10^5 unidades transfectantes/mL.

9. Microinyección y grabación *in vivo* de los cultivos organotípicos para el estudio del transporte mitocondrial axonal.

El día de preparación de los cultivos organotípicos, 2 horas después de colocar los cortes de cerebelo de ratón sobre los filtros, se microinyectaron las partículas lentivirales junto a los somas de las células de Purkinje mediante un microinyector (InjectMan, Eppendorf) y un micromanipulador (FemtoJet, Eppendorf) acoplados a un microscopio confocal de disco giratorio (Spinning disk, Andor). Se siguió el protocolo descrito en Kasri *et al.* (2008). Se utilizaron capilares de borosilicato de 2 mm de diámetro externo (Warner Instruments) estirados para conseguir un diámetro en la punta de entre 5 y 15 μm . Se realizaron entre 3 y 4 inyecciones por corte.

Tras 7 días de reposo para permitir la estabilización de los cultivos, la infección de las neuronas de Purkinje por parte de los lentivirus y la expresión de la proteína fluorescente DsRed2 en las mitocondrias neuronales; se estimularon los cultivos durante 24 horas con LPS (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o H_2O_2 (500 μM). Al día siguiente, los cultivos se prepararon para su grabación, cortando el filtro alrededor de los mismos y sumergiéndolos en 1 mL de medio de cultivo en placas de Petri con el fondo de cristal (Glass bottom dishes, MatTek Corporation). Los axones de las neuronas de Purkinje que habían expresado la proteína fluorescente en sus mitocondrias fueron grabados durante 15 minutos mediante un microscopio confocal de disco giratorio (Spinning disk, Andor). Los vídeos resultantes se analizaron mediante el software IMARIS (Bitplane).

10. Valoración de la función mitocondrial mediante respirometría de alta resolución.

Se empleó el sistema Oxygraph-2k (Oroboros Instruments) para los estudios de respirometría de alta resolución. Para tales medidas se homogeneizaron 15 cortes de cultivos organotípicos de cerebelo de cada condición en 150 μ L de buffer de respiración mitocondrial MiR05 (Gnaiger *et al.*, 2000) (0,5 mM EGTA, 3 mM $MgCl_2$, 60 mM K-lactobionate, 20 mM taurine, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 110 mM sucrose, 1 g/l BSA, pH 7,1). Se añadieron 100 μ L del homogeneizado en las distintas cámaras del respirómetro en las cuales ya había 2mL de MiR05. Mediante el cálculo de la derivada negativa del consumo de oxígeno respecto al tiempo, el DatLab (software asociado al Oxygraph-2k) provee los valores de respiración en cada uno de los estados previamente definidos.

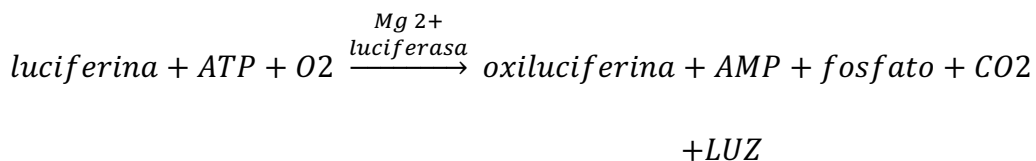
El protocolo SUIT (substrate-uncoupler-inhibitor titration) fue el siguiente (las concentraciones indicadas corresponden a las concentraciones finales en las cámaras): malato (2mM, Sigma) y glutamato (10mM, Sigma) para la medida del estado **LEAK** de respiración desacoplada (debida a la fuga de protones, y circuito de electrones y cationes que no dependen de la actividad de la ATP sintasa); ADP (5mM, Calbiochem) + $MgCl_2$ (0,6 moles por cada mol de ADP) para la medida de la respiración a través del **complejo I**, NADH-dependiente, denominado estado **OXPHOS** (donde el gradiente de protones bombeados a la matriz intermembrana son utilizados parcialmente por la ATP sintasa para la fosforilación oxidativa o respiración acoplada y disipados también parcialmente debido a la fuga de protones o respiración desacoplada); el citocromo C (10uM, Sigma) se añade a la cámara en este punto para comprobar que la membrana no se haya dañado durante la preparación de la muestra (no debe de observarse un aumento significativo en el consumo de

oxígeno); succinato (10 mM, Sigma) para medir la respiración del **complejo II** FADH₂-dependiente junto a la respiración del complejo I en el estado **OXPHOS CI+CII**; oligomicina (2 µg/ml, Sigma) para detectar la respiración endógena desacoplada de la síntesis de ATP a través de sustratos de los complejos I y II; FCCP (0,5 µM + 0,5 µM, Sigma) en seguidas adiciones hasta llegar al máximo de respiración para cuantificar la capacidad máxima del sistema de transferencia de electrones mediante el desacoplamiento no fisiológico de la membrana interna mitocondrial (estado **ETS CI+II**); rotenona (0,5 µM, Sigma) para inhibir el complejo I y así poder estudiar la respiración máxima que corresponde sólo al complejo II (**ETS CII**); antimicina A (2,5 µM, Sigma) para inhibir el complejo III y así determinar el estado **ROX** que nos muestra cualquier respiración no mitocondrial y nos permite sustraer ese valor a los anteriores. Finalmente se añadieron ascorbato (2 mM, Sigma) y TMPD (0,5 mM, Sigma) para estudiar la respiración que corresponde sólo al **complejo IV**. El ascorbato se añade para evitar la auto-oxidación del TMPD y mantenerlo en su estado reducido. A lo largo de todo el protocolo SUI, cada reactivo no se añadió hasta que la señal respiratoria anterior no fuese estable (al menos durante 2-3 minutos).

Tras el ensayo de respirometría, se midieron las proteínas totales de cada muestra mediante el método de Bradford (Sigma) (Bradford, 1976), para la normalización de los cálculos de los valores de respiración.

11. Medida de la cantidad de ATP en los cultivos organotípicos.

Para medir la cantidad de ATP producida en los cultivos, se utilizó un ensayo de bioluminiscencia comercial (Molecular Probes) basado en los requerimientos de ATP de la enzima luciferasa para producir luz (emisión máxima a 560nm) según la siguiente reacción:



Los experimentos se llevaron a cabo según el protocolo establecido por el fabricante. Tras las estimulaciones, los cortes de cada pocillo se recogieron en 50 µl de agua destilada y se homogeneizaron mediante una jeringa y una aguja 25G. Posteriormente, se colocaron en una placa negra de 96 pocillos, en la que también se preparó una recta patrón de concentraciones crecientes de ATP entre 0,001 y 1 nM. Finalmente, se colocó la placa con las muestras y la recta patrón en la base para placas del luminómetro (GloMax, Promega) y la solución de reacción en el inyector, para proceder a la reacción catalizada por la luciferasa y la lectura de la luz emitida durante la misma (parámetros de lectura: tiempo de retraso 1 segundo, tiempo de integración 10 segundos, volumen inyectado de solución de reacción 100µl).

12. Análisis estadístico.

En todas las gráficas se presenta la media \pm error estándar. Para los experimentos que contienen sólo dos condiciones y un punto temporal (control negativo y 24h LPS) se ha utilizado el test de t-Student o su homólogo no paramétrico U-Mann Whitney en los casos que las muestras no siguen una distribución normal. Para el resto de experimentos se han utilizado ANOVA de una vía o de dos vías, más comparaciones post-hoc mediante el test de Dunnet; o su equivalente no paramétrico el test de Kruskal-Wallis y comparaciones 2 a 2 mediante U-Mann Whitney con la corrección de Bonferroni (siempre respecto al control negativo no estimulado). Para los análisis de frecuencias se ha utilizado el test de χ^2 (chi-cuadrado). Los valores de p se han representado como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Para realizar los análisis estadísticos se han utilizado los softwares SPSS 15.0 (IBM) y GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).



VI. RESULTADOS

1. Caracterización del modelo de neuroinflamación in vitro: cultivos organotípicos de cerebelo de ratón estimulados con LPS.

Como primer paso para estudiar el efecto de la neuroinflamación en la biología de las mitocondrias axonales, optimizamos un modelo de neuroinflamación *in vitro* que permite realizar estudios de imagen dinámica y estudios moleculares de gran precisión (comparado con modelos animales, en los que es difícil realizar imagen *in vivo* y con líneas celulares o cultivos primarios *in vitro*, dado que no participarían todas las poblaciones celulares necesarias: neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y microglía). Por estos motivos, empleamos los cultivos organotípicos de cerebelo, que contienen todas las poblaciones celulares de interés, contienen numerosos axones mielinizados (comparados con cultivos de hipocampo) y sufren una degeneración axonal limitada (comparada con los cultivos de médula espinal). Se seleccionó como estímulo el LPS porque está bien descrito que activa la microglía mediante el receptor TLR4 (Chao *et al.*, 1992; Lehnardt *et al.*, 2002), activando la respuesta inmune innata. En segundo lugar, comparamos los resultados del modelo de neuroinflamación estimulado con LPS con un modelo de estrés oxidativo estimulado con peróxido de hidrogeno para establecer las similitudes entre ambos modelos y definir la contribución del estrés oxidativo a la respuesta mitocondrial en el daño axonal durante la neuroinflamación.

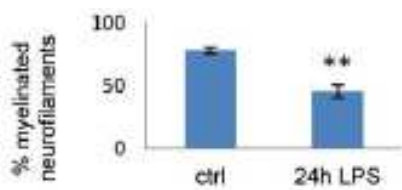
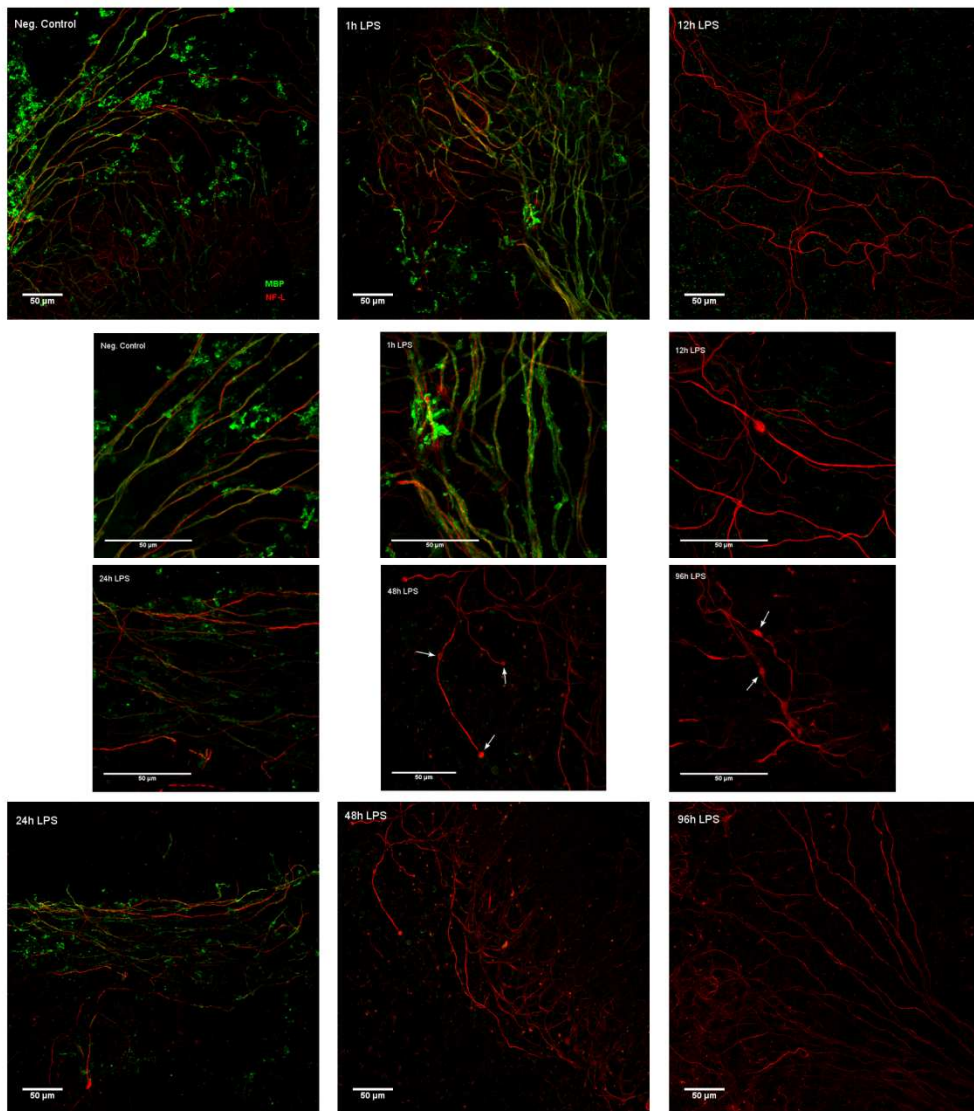
En este trabajo, caracterizamos los procesos de desmielinización, daño axonal, estrés oxidativo y producción de citoquinas proinflamatorias en el modelo para identificar el contexto de daño en el cual se va a medir la función mitocondrial en los axones. Los resultados de esta caracterización fueron publicados en el artículo Di Penta *et al.*, 2013 (Anexo 1) y en los cuales la doctoranda colaboró en los siguientes procesos:

- Preparación de los cultivos organotípicos y estimulación de los mismos.
- Recogida de muestras para inmunofluorescencias, western blots y ELISA.
- Realización de las inmunofluorescencias MBP+NFL y SMI32+NFH, y la adquisición de imágenes por microscopía confocal (figuras 1 y 3 del artículo).
- Realización completa de los ensayos de medida de especies reactivas de oxígeno, ROS (figura 2 del artículo), desde la preparación de los cultivos, estimulaciones y ensayo de medida de ROS, hasta el análisis de resultados.

1.1. Desmielinización.

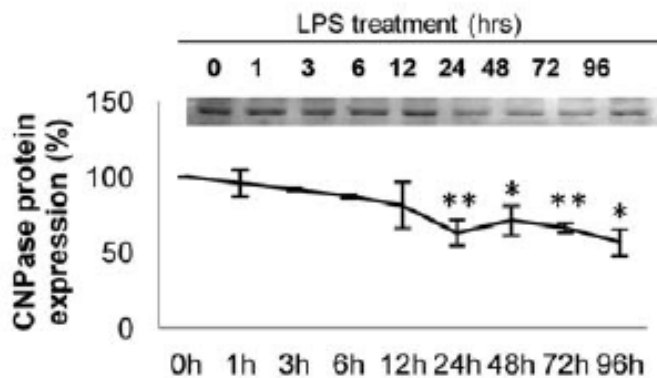
Para comprobar el estado de la mielina en los cultivos organotípicos de cerebelo estimulados con LPS, se realizó una doble inmunofluorescencia para la proteína básica de la mielina (MBP) como marcador de las vainas de mielina y para la subunidad ligera de los neurofilamentos (NF-L) como marcador axonal. Tras 12 horas del estímulo neuroinflamatorio, se observa una clara pérdida de la mielina, que se mantiene a lo largo de todo el tiempo de estimulación (96 horas), tal y como puede observarse en la figura 7. La desmielinización se cuantificó para el punto temporal de 24 horas como el porcentaje de axones envueltos por mielina (es decir, axones NF-L positivos y MBP positivos) respecto al número total de axones de cada imagen (todos los axones NF-L positivos). El porcentaje de axones mielinizados disminuye significativamente a las 24 horas de estimulación con LPS.

Figura 7. Doble inmunofluorescencia (MBP+NF-L) de los cultivos organotípicos estimulados con LPS. La gráfica representa el porcentaje de axones mielinizados (doble positivos para MBP y NF-L) respecto al número total de axones a las 24 horas de estimulación con LPS. Barras de escala = 50um.



Además, se cuantificó la expresión de la enzima CNPasa en los cultivos mediante Western-Blot. Esta enzima está presente en oligodendrocitos maduros y juega un papel crítico en el proceso de mielinización axonal (Gravel *et al.*, 1996). La cantidad de CNPasa desciende significativamente en los cultivos a partir de las 24 horas de estimulación con LPS. Este descenso se mantiene hasta las 96 horas, alcanzando una pérdida del 40% de la cantidad de CNPasa en los cultivos sin estimular (control negativo, 0 horas), figura 8.

Figura 8. Cuantificación de la expresión de CNPasa por WB. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al control sin estimular (100%).



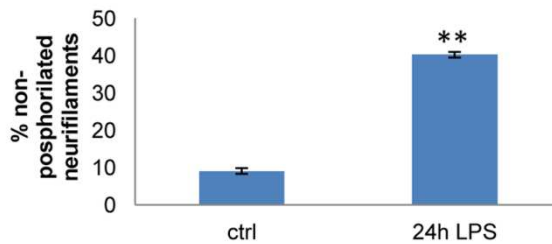
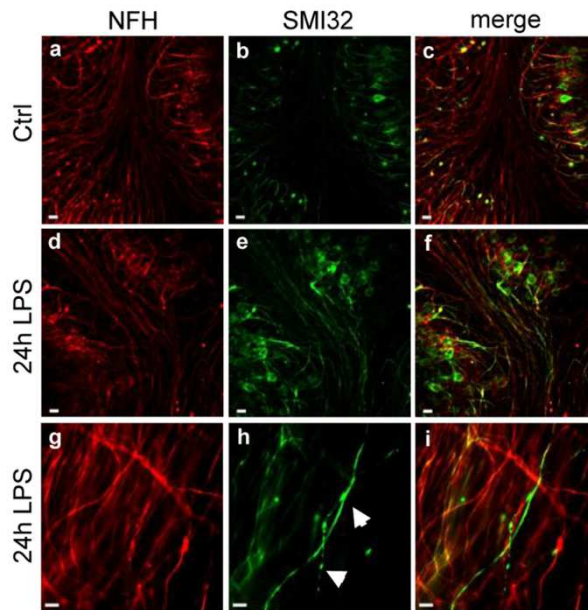
1.2. Daño axonal.

La aparición de esferoides o bulbos axonales es un claro síntoma de que se está produciendo un fallo en el transporte axonal (Coleman, 2005) y por tanto daño axonal. Estos esferoides aparecen preferentemente en los nodos de Ranvier y en ellos se acumulan orgánulos y citoesqueleto desorganizado. Con el tiempo crecen en tamaño y acaban provocando la degeneración Walleriana de la parte distal de los axones.

En la figura 7 se puede apreciar que a partir de las 48 horas de estimulación con LPS comienzan a aparecer bulbos axonales en los cultivos organotípicos. Las flechas blancas de las imágenes centrales de mayor aumento señalan varios bulbos axonales en los puntos temporales de 48 y 96 horas de estimulación con LPS.

Los neurofilamentos axonales están constituidos por tres subunidades distintas: ligera L, media M y pesada H. Las subunidades M y H pueden fosforilarse, dando lugar a puentes entre filamentos que fortalecen la estructura axonal. Para estudiar más profundamente el daño axonal de los cultivos, se utilizó una doble inmunofluorescencia para neurofilamentos desfosforilados (SMI-32, que se une a la subunidad H desfosforilada) y para neurofilamentos totales (todas las subunidades H, fosforiladas y desfosforiladas). En estudios previos (Trapp *et al.*, 1998) se han observado una gran cantidad de neurofilamentos desfosforilados en lesiones de pacientes con EM. En los cultivos organotípicos, la presencia de neurofilamentos desfosforilados se multiplica por 4 a las 24 horas de estimulación con LPS (figura 9).

Figura 9. Doble inmunofluorescencia para neurofilamentos totales (subunidad H, NFH) y neurofilamentos desfosforilados (subunidad H, SMI32). Las imágenes g-i son ampliificaciones de las imágenes d-f. Barras de escala = 20um (imágenes a-f) y 10um (imágenes g-i). La gráfica muestra el porcentaje de neurofilamentos desfosforilados respecto de los neurofilamentos totales.



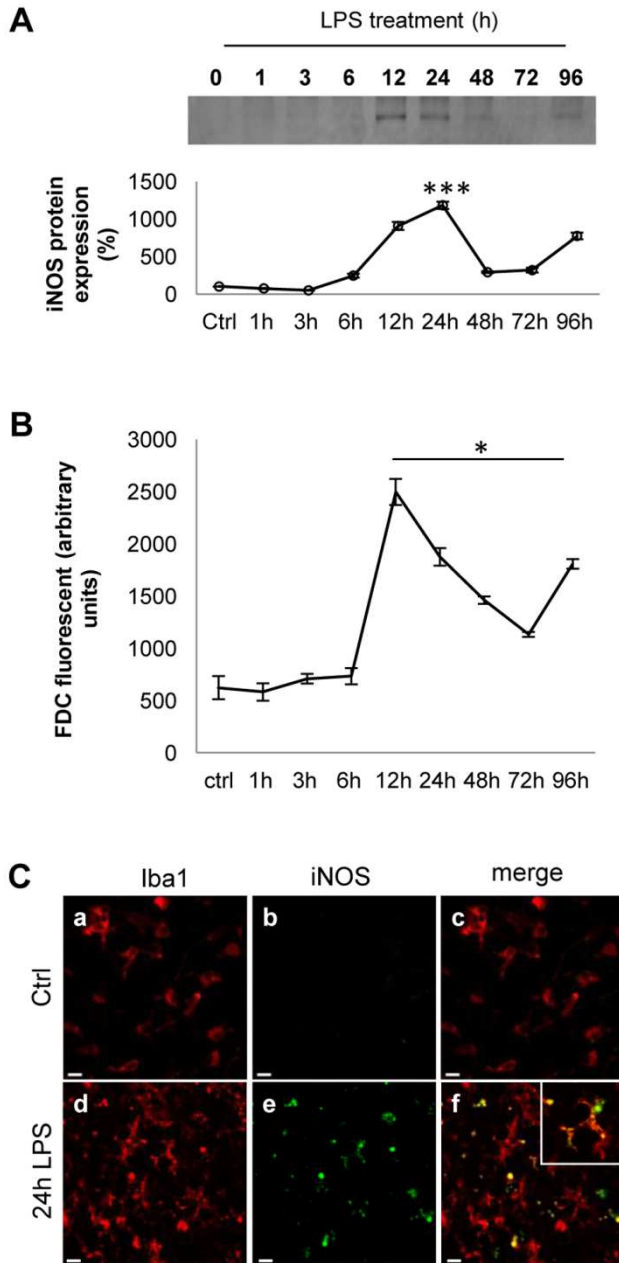
1.3. Estrés oxidativo.

Para evaluar si el estímulo con LPS produce estrés oxidativo en los cultivos organotípicos se estudió, por un lado, la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y, por otro lado, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Los western blots mostraron un incremento de los niveles de la enzima iNOS a partir de las 12 horas de estimulación con LPS, con un máximo significativo a las 24 horas (figura 10A). Se comprobó qué células eran las principales productoras de la enzima mediante inmunofluorescencia, resultando ser la microglía la principal productora de iNOS (figura 10C).

El reactivo CM-H₂DCFDA (Molecular Probes) penetra en las células en su forma reducida no fluorescente. Dentro de las células es oxidado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) alcanzando su forma fluorescente. Tras incubar los cultivos organotípicos con este reactivo, se produce un incremento de la fluorescencia con el tiempo de estimulación con LPS, alcanzando un máximo de producción de ROS a las 12 horas (figura 10B) que se mantiene significativamente incrementado hasta las 96 horas de estimulación. Este máximo de producción de ROS coincide con el aumento de la expresión de la enzima iNOS (figura 10A) principalmente en células de microglía (figura 10C).

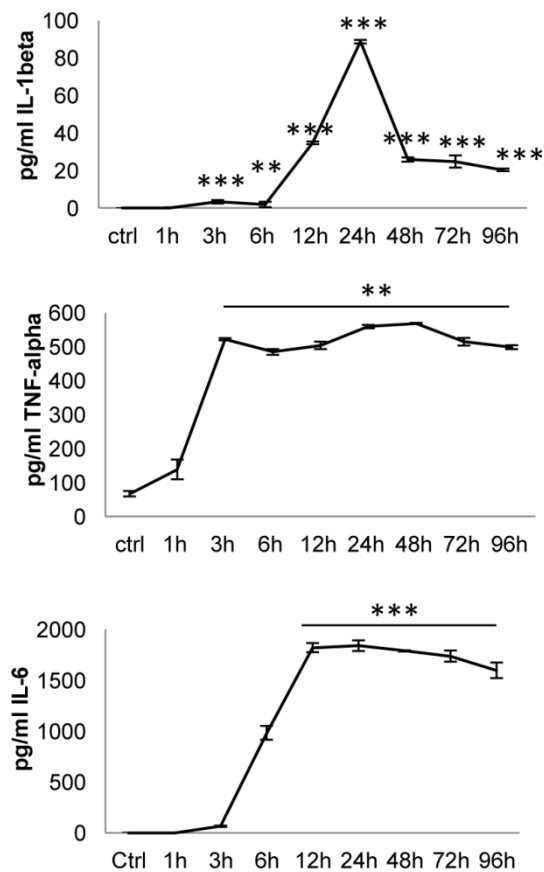
Figura 10. Estrés oxidativo en los cultivos organotípicos estimulados con LPS. **A)** WB de la enzima iNOS, los cambios de expresión se expresan como porcentajes respecto al control no estimulado. **B)** Cuantificación de la cantidad de ROS en los cultivos mediante espectrofluorimetría. **C)** Doble inmunofluorescencia para microglía (Iba1) e iNOS. Barras de escala = 10um.



1.4. Citoquinas proinflamatorias.

Se estudió la producción de citoquinas proinflamatorias en los sobrenadantes de los cultivos estimulados con LPS mediante ELISA. Se observaron máximos de producción para las citoquinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 a las 24, 3 y 12 horas de estimulación con LPS respectivamente (figura 11). La producción de IL-1 β es transitoria, mientras que los niveles incrementados de TNF- α e IL-6 se mantienen a lo largo de todo el tiempo de estimulación.

Figura 11. Producción de citoquinas proinflamatorias en los cultivos organotípicos estimulados con LPS.



1.5. Punto temporal de referencia para los estímulos de LPS y H₂O₂ en el estudio de la biología mitocondrial.

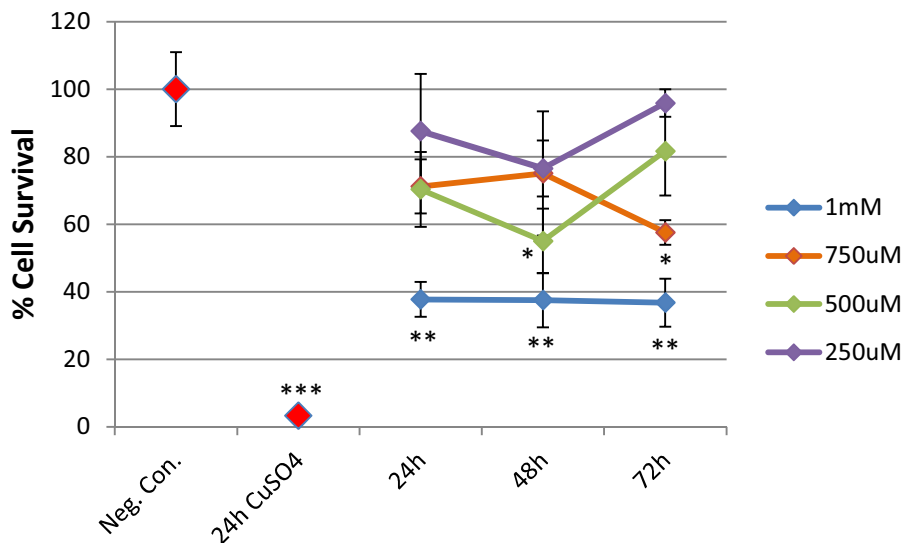
Algunos de los experimentos relacionados con el estudio de la biología mitocondrial, cuyos resultados se muestran en los siguientes apartados, resultaban inabarcables si se tenían en cuenta todos los puntos temporales utilizados para la caracterización del modelo (de 1 a 96 horas de estimulación). Concretamente, si se tenían en cuenta todos los tiempos para los experimentos de transporte mitocondrial axonal (apartado 3 de la sección de resultados), se obtenían demasiadas horas de grabación para ser posteriormente analizadas. Y en cuanto a los ensayos de respirometría (apartado 4 de la sección de resultados) se necesitaban demasiados cortes de cerebelo para poder llevar a cabo los experimentos, lo cual hubiera incrementado enormemente el número de ratones utilizados.

Así pues, se tomó como referencia para dichos experimentos el punto temporal de 24 horas, tanto para el estímulo neuroinflamatorio (LPS, 15 µg/ml) como para el estímulo de estrés oxidativo (H₂O₂, 500 µM). A las 24 horas de estimulación con LPS, se observó una clara desmielinización de los cultivos (descenso del porcentaje de axones mielinizados a la mitad y descenso significativo de la expresión de CNPasa), daño axonal (aumento del número de neurofilamentos desfosforilados), estrés oxidativo (aumento de la enzima iNOS y de las especies reactivas de oxígeno) e inflamación (aumento de la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1β, TNF-α e IL-6).

Respecto al estímulo de estrés oxidativo con el H₂O₂, también se observaron a las 24 horas una disminución del porcentaje de axones mielinizados y de la expresión de la enzima CNPasa, un aumento del número de neurofilamentos desfosforilados y un aumento de la enzima iNOS y de la

producción de especies reactivas de oxígeno. Todos estos resultados están recogidos en la figura 4 de la publicación Di Penta *et al.*, 2013 (Anexo 1); sin embargo, la concentración de H₂O₂ que se utilizó en los mismos fue de 1 mM. Posteriormente, mediante un ensayo de supervivencia celular utilizando el reactivo MTT, se comprobó que esa concentración de H₂O₂ era demasiado tóxica para largos tiempos de estimulación (figura 12), por lo que se decidió utilizar la concentración de 500 µM en el estudio de la biología mitocondrial.

Figura 12. Supervivencia de los cultivos organotípicos de cerebelo estimulados con distintas concentraciones de H₂O₂ a distintos tiempos. Los valores se expresan como porcentajes respecto del control negativo no estimulado (considerado como el 100% de supervivencia celular). Como control positivo de muerte celular se incubaron cultivos organotípicos con sulfato de cobre (CuSO₄) 150 µM durante 24 horas.



2. Morfología mitocondrial axonal en neuroinflamación (LPS) y estrés oxidativo (H₂O₂).

Para el estudio de la morfología de las mitocondrias axonales en las situaciones de neuroinflamación (estímulo LPS) y estrés oxidativo (estímulo H₂O₂), se prepararon cultivos organotípicos de cerebelo para su observación mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). El análisis se realizó en los tractos de sustancia blanca que permiten identificar axones en cortes longitudinales. Aquellas secciones en las que se identificaban axones con mitocondrias en su interior, fueron seleccionadas para el análisis de la morfología mitocondrial.

2.1. Método de segmentación para el análisis de las electromicrografías.

Dos diferentes áreas de interés se seleccionaron a mano para cada mitocondria, el perímetro externo (línea roja) y el perímetro interno de las crestas mitocondriales (línea amarilla) (figura 13). Se analizaron al menos 50 mitocondrias de dos experimentos diferentes para cada condición. En las gráficas de los próximos apartados quedan representados los parámetros incluidos en la tabla 2 (media ± error estándar).

Figura 13. Análisis de la morfología mitocondrial axonal. La imagen de la izquierda muestra una sección de sustancia blanca de cerebelo con un axón cortado de forma longitudinal que contiene una mitocondria (intra-axonal). Las mitocondrias así identificadas (imagen de la derecha a mayor aumento), fueron segmentadas de forma manual, seleccionando el perímetro externo (marcado con una línea roja) y el perímetro interno de las crestas mitocondriales (marcado con una línea amarilla). Barras de escala = 1 μm (imagen izquierda) 500 nm (imagen derecha).

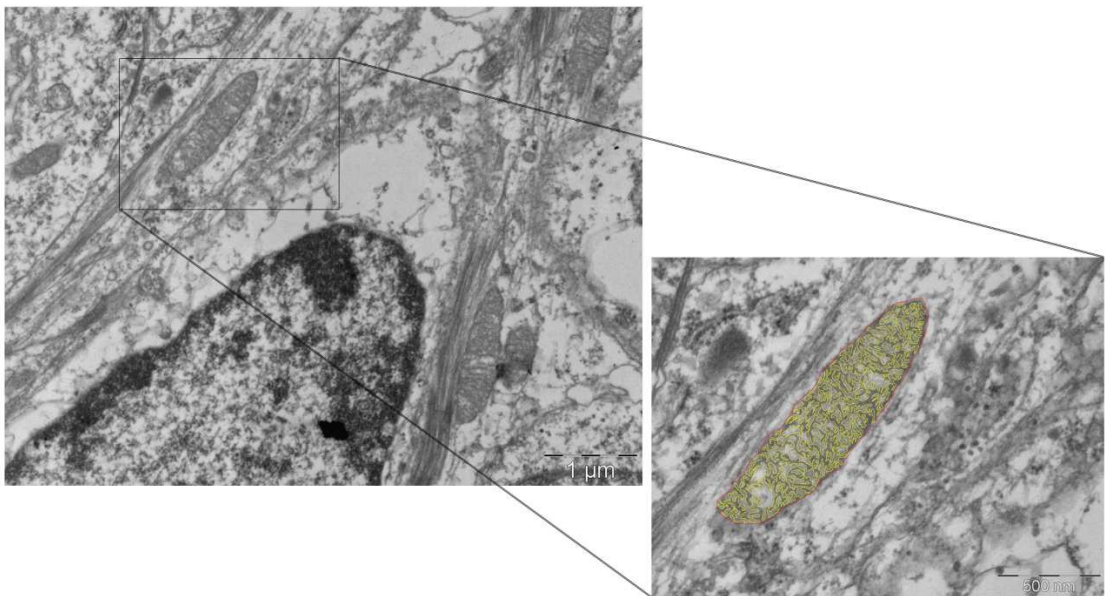


Tabla 2. Parámetros morfológicos mitocondriales analizados mediante TEM (Picard *et al.* 2013, Dickey & Strack 2011).

Parámetro	Significado
Área mitocondrial <i>Mitochondrial Area</i>	Área total de cada mitocondria
Perímetro mitocondrial <i>External Perimeter</i>	Perímetro externo mitocondrial
Diámetro de Feret <i>Feret's Diameter</i>	La distancia más larga entre dos puntos cualquiera del perímetro de una mitocondria
Circularidad <i>Circularity</i>	Índice bidimensional de esfericidad con valores de 1 indicando esferoides perfectos $Circ = \frac{4\pi \cdot Area}{(Perimeter)^2}$
Redondez <i>Roundness</i>	Índice bidimensional de esfericidad con valores de 1 indicando esferoides perfectos $Round = \frac{4 \cdot Area}{\pi(minor axis)^2}$
<i>Aspect Ratio (AR)</i>	Refleja el ratio entre largura y anchura $AR = \frac{Major Axis}{Minor Axis}$
Perímetro de las crestas/ Perímetro externo <i>Cristae Perim./ Mit Perim.</i>	Ratio entre el perímetro de las crestas mitocondriales y el perímetro externo. Refleja la complejidad de las crestas mitocondriales.

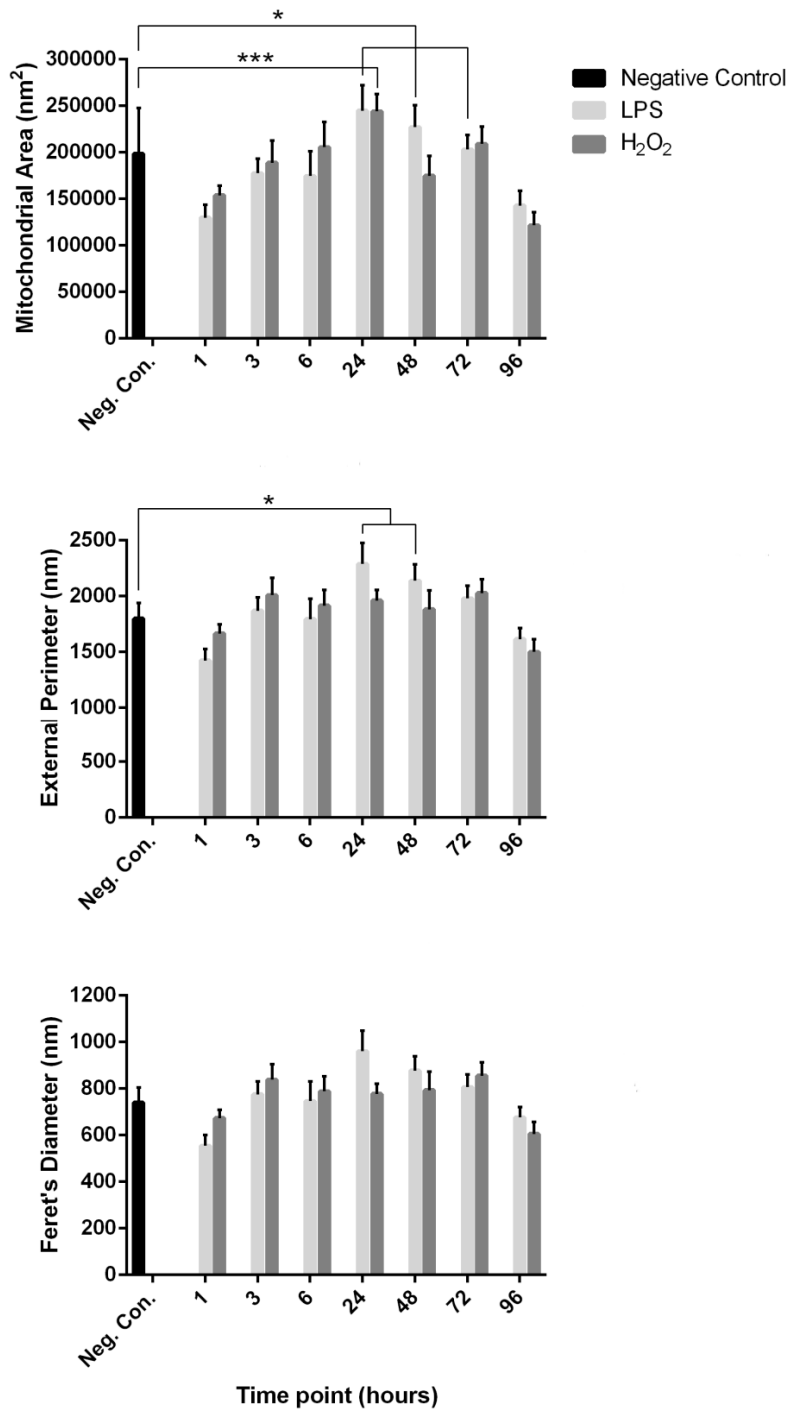
2.2. Tamaño de las mitocondrias axonales.

Para estudiar si el tamaño de las mitocondrias axonales cambia durante la neuroinflamación o durante el estrés oxidativo, se analizaron tres parámetros morfológicos (área, perímetro externo y diámetro de Feret) a distintos tiempos de estimulación.

Con el estímulo inflamatorio (LPS) las mitocondrias axonales aumentan su tamaño (figuras 14 y 17). Se observaron diferencias significativas a las 24, 48 y 72 horas de estimulación en el área mitocondrial, y a las 24 y 48 horas de estimulación en el perímetro externo (respecto al control negativo). No se observaron diferencias significativas en el diámetro, aunque también hay una tendencia al alza a las 24 horas.

Durante el estrés oxidativo (H_2O_2), las mitocondrias axonales también aumentan su tamaño aunque en menor medida (figura 14). Sólo se apreció un aumento significativo del área mitocondrial a las 24 horas de estimulación.

Figura 14. Área mitocondrial, perímetro externo y diámetro de Feret de las mitocondrias axonales de los cultivos organotípicos de cerebelo.



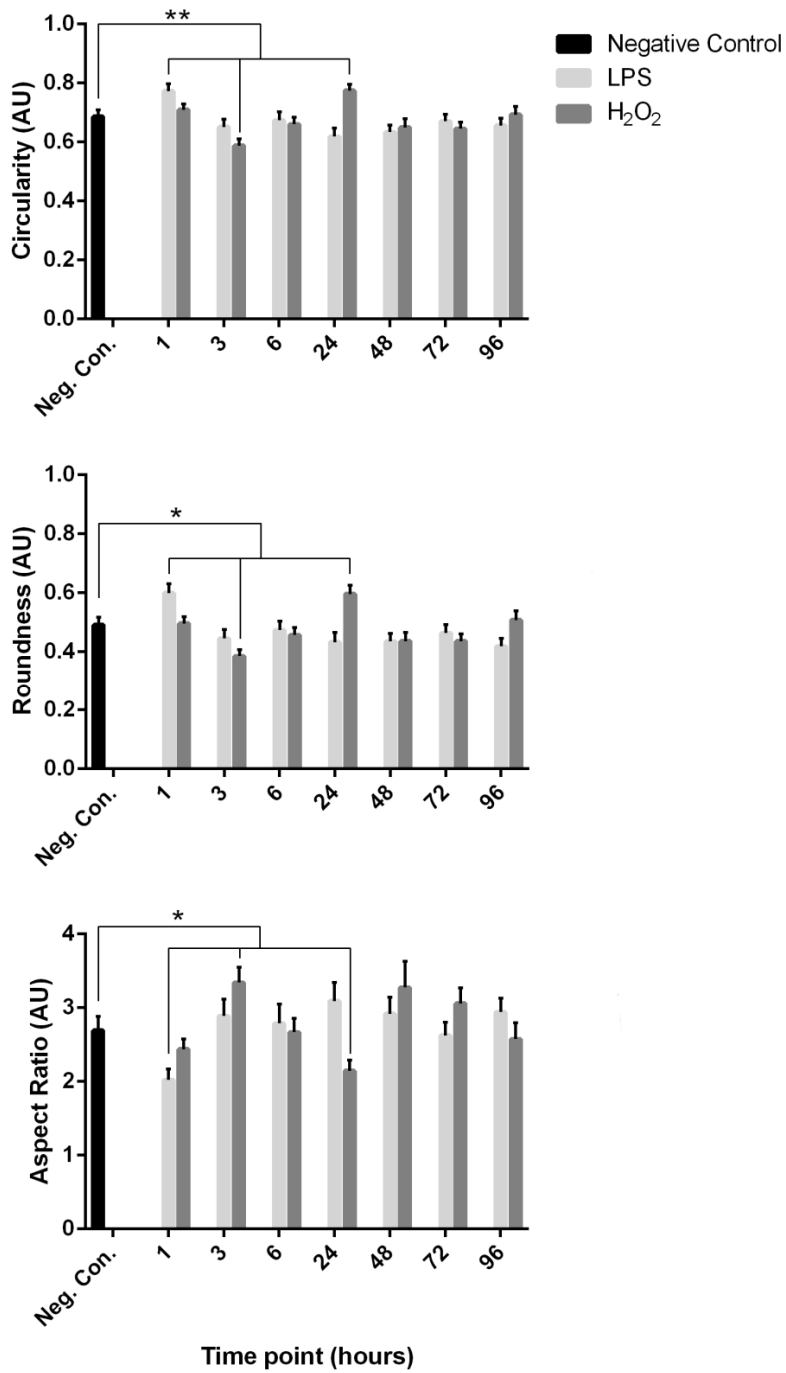
2.3. Forma de las mitocondrias axonales.

También se analizó si la forma de las mitocondrias axonales cambiaba durante la neuroinflamación o durante el estrés oxidativo. Para ello se estudiaron otros tres parámetros morfológicos (circularidad, redondez y AR) a distintos tiempos de estimulación. La circularidad y la redondez son índices equivalentes, en los que valores próximos a 1 corresponden a mitocondrias esféricas, mientras que valores próximos a 0 corresponden a mitocondrias muy alargadas. El parámetro AR es la división entre el eje mayor de la mitocondria y el eje menor, por lo que un valor de 1 correspondería a una mitocondria esférica.

Durante la neuroinflamación (LPS) las mitocondrias axonales apenas modifican su aspecto, no son más redondeadas o alargadas que respecto al control negativo (figura 15). Tan sólo al principio de la estimulación (1 hora) son más redondeadas que en los controles negativos. El AR, durante la mayor parte del estímulo con LPS se encuentra entorno a valores de 3 (exceptuando el punto temporal de 1 hora en que el AR se encuentra en torno a valores de 2), lo cual significa que el eje mayor de las mitocondrias es tres veces más largo que el eje menor. Es decir, las mitocondrias son bastante alargadas. En el control negativo el valor medio del AR es de 2,69.

Con el estímulo de estrés oxidativo (H_2O_2) tampoco modifican mucho su aspecto (figura 15). A las 3 horas de estimulación las mitocondrias axonales son significativamente más alargadas, y a las 24 horas son significativamente más redondeadas. Si nos fijamos los valores del AR, éstos fluctúan entorno al valor del control negativo tomando valores entre 2,14 (24 horas) y 3,34 (3 horas).

Figura 15. Circularidad, redondez y AR de las mitocondrias axonales de los cultivos organotípicos de cerebelo. Son parámetros adimensionales.



2.4. Crestas mitocondriales.

Por último, se analizó la complejidad de las crestas mitocondriales en las cuales se alojan los complejos encargados de la fosforilación oxidativa y la producción de ATP. Los cambios en la morfología de la membrana interna mitocondrial representan una forma de regulación metabólica (Hackenbrock, 1966; Mannella, 2006; Cogliati *et al.*, 2013). Para ello, se calculó el ratio entre el perímetro de las crestas mitocondriales y el perímetro externo.

En ambos casos (LPS y H₂O₂) el ratio entre el perímetro interno de las crestas y el perímetro externo mitocondrial aumenta muy significativamente para todos los tiempos de estimulación (figuras 16 y 17). Esto indica que tanto el estímulo inflamatorio como el estrés oxidativo provocan un aumento de la complejidad de las crestas de las mitocondrias axonales.

Figura 16. Ratio entre el perímetro interno de las crestas y el perímetro externo mitocondrial. Es un parámetro adimensional.

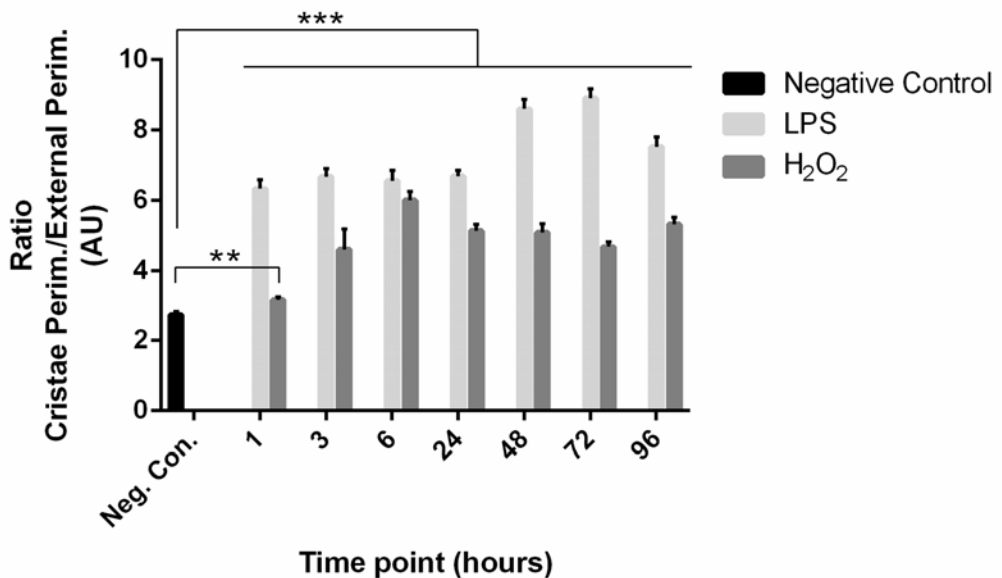
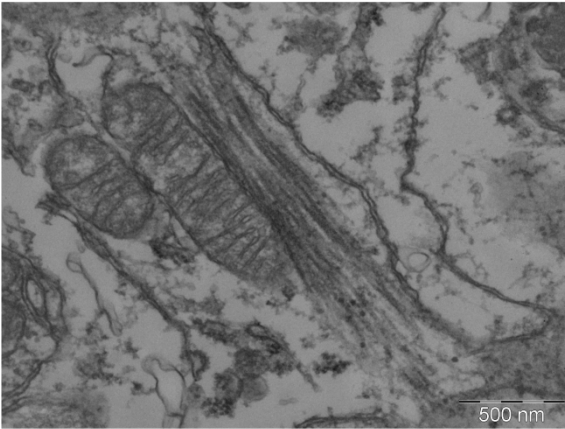
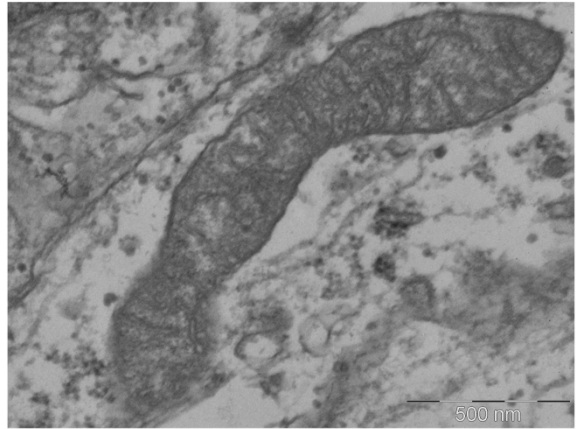


Figura 17. Electromicrografías correspondientes a mitocondrias axonales de cultivos organotípicos de cerebelo sin estimular y tras 24 horas de estimulación con LPS. Barras de escala = 500 nm.

Negative Control



24h LPS



3. Transporte mitocondrial axonal en neuroinflamación (LPS) y estrés oxidativo (H₂O₂).

El transporte mitocondrial axonal es muy importante para la correcta localización de las mitocondrias en los lugares de mayor demanda energética como los nodos de Ranvier y el terminal sináptico; así como para la renovación de las mitocondrias a medida que pierden su eficacia respiratoria. Por dicho motivo, un fallo en el transporte mitocondrial puede resultar crítico para la supervivencia axonal aunque la función mitocondrial *per se* no esté alterada. Para el estudio del transporte mitocondrial axonal se utilizó una técnica de imagen *in vivo*, marcando con fluorescencia las mitocondrias neuronales mediante la microinyección de partículas lentivirales (que contenían la secuencia MitoDsRed2) junto a los somas de las células de Purkinje. Tras 24 horas de estimulación con LPS y H₂O₂, se grabaron los axones de dichas neuronas mediante el sistema *spinning disk* y se analizaron los vídeos con el programa Imaris. Los experimentos se repitieron 3 veces y se grabaron al menos 10 axones por condición. En las gráficas se muestra la media ± error estándar.

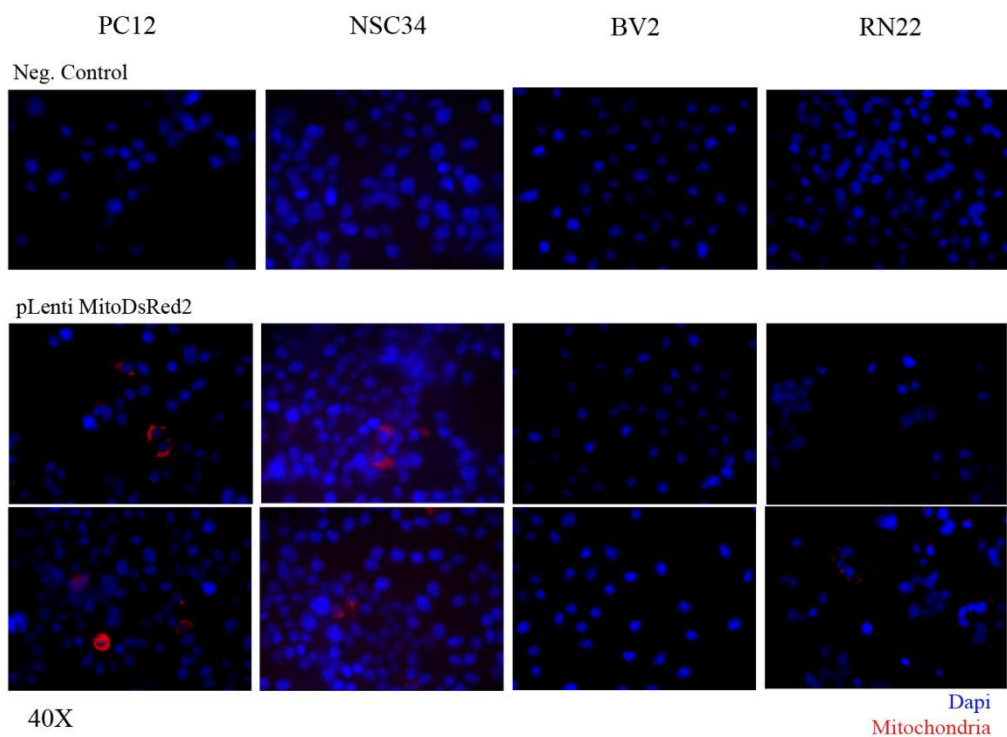
3.1. Comprobación de la infectividad del lentivirus en distintas líneas celulares.

Las partículas lentivirales producidas infectan preferentemente neuronas y no células gliales, por el vector lentiviral utilizado. Para confirmar la especificidad del marcaje de mitocondrias neuronales y no gliales, se transfectaron cuatro líneas celulares diferentes: PC12 (células derivadas de feocromocitoma de médula adrenal de rata que tratadas con NGF se diferencian a células similares a neuronas), BV2 (células derivadas de microglía

de ratón), NSC34 (células derivadas de motoneuronas) y RN22 (células derivadas de Schwannoma de rata).

Después de la transfección, sólo se observaron mitocondrias fluorescentes en las líneas celulares PC12 y NSC34 (figura 18), confirmándose que el lentivirus sólo infecta neuronas y no tiene capacidad para infectar células gliales.

Figura 18. Imágenes de las cuatro líneas celulares transfectadas con pLenti-MitoDsRed2, y los correspondientes controles negativos no transfectados.



3.2. Supervivencia de los cultivos organotípicos microinyectados.

Para comprobar si los cultivos organotípicos sobrevivían al proceso de la microinyección, se realizó un ensayo de supervivencia celular utilizando el reactivo MTT después de 7 DIV tras la microinyección. Los cultivos organotípicos microinyectados no sufrían daños por la micromanipulación, su porcentaje de supervivencia era similar al de cultivos organotípicos no microinyectados y mantenidos el mismo número de días *in vitro* (Figura 19).

Figura 19. Supervivencia de los cultivos organotípicos microinyectados con partículas lentivirales. Los valores se expresan como porcentajes respecto del control negativo no microinyectado (considerado como el 100% de supervivencia celular). Como control positivo de muerte celular se incubaron cultivos organotípicos con sulfato de cobre (CuSO_4) 150 μM durante 24 horas.

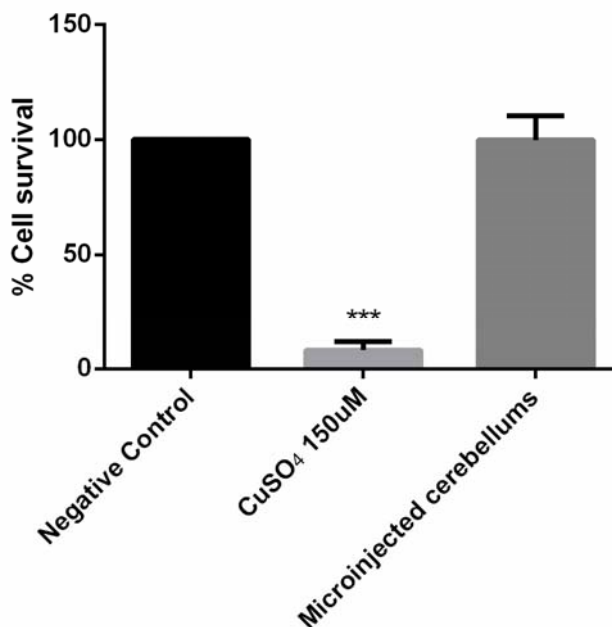
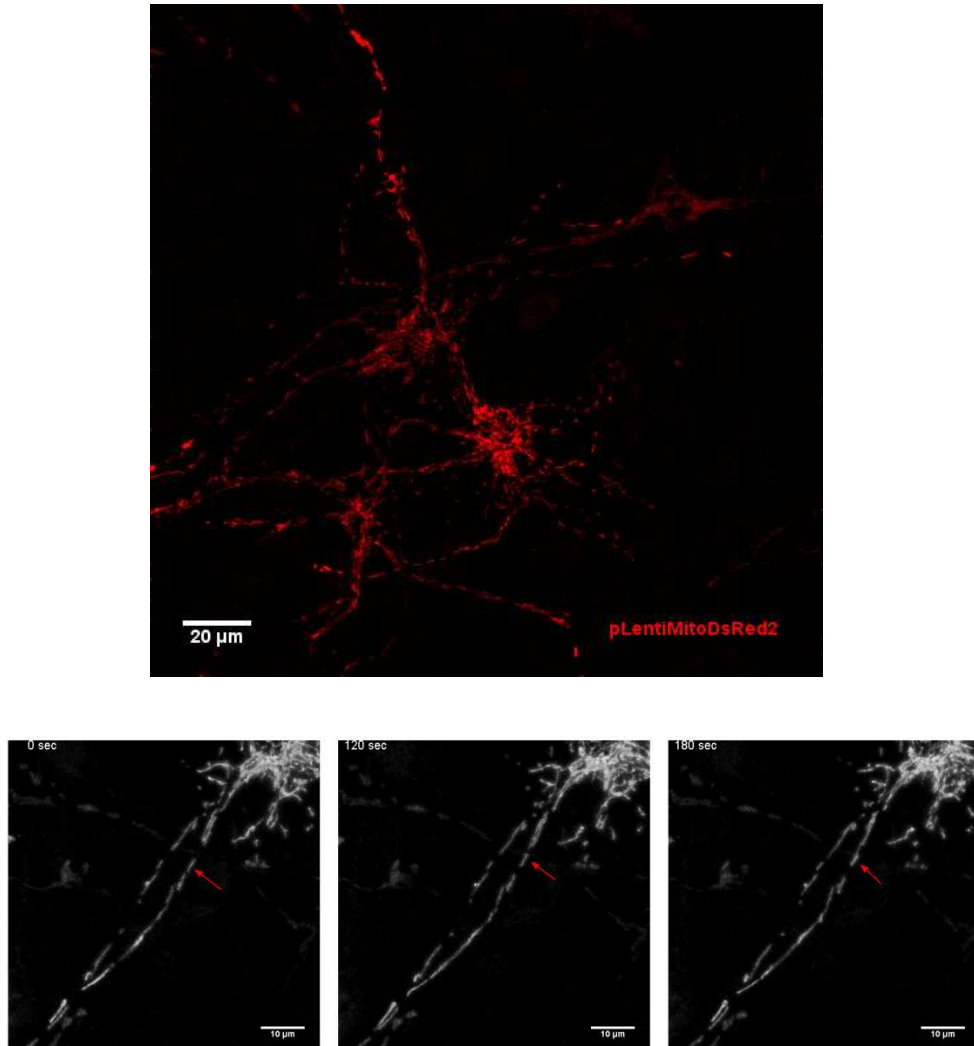


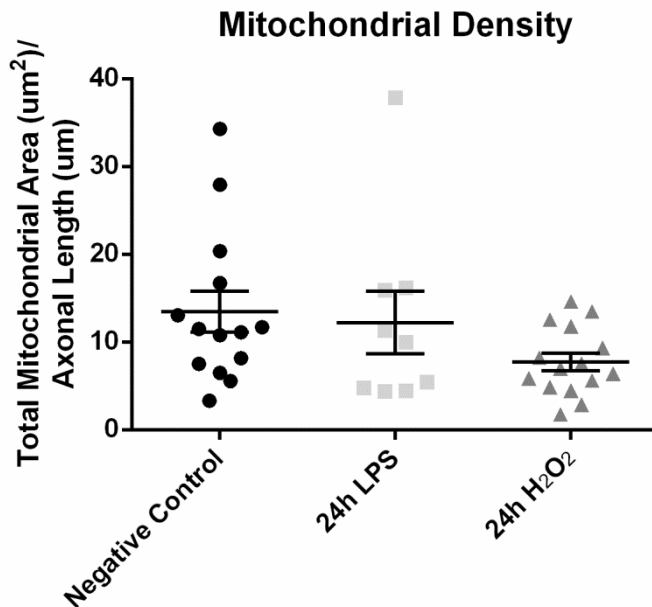
Figura 20. Imágenes de neuronas de Purkinje obtenidas mediante Spinning disk en cultivos organotípicos de cerebello microinyectados con el lentivirus. La imagen superior muestra la expresión del vector lentiviral en las neuronas. Las imágenes inferiores corresponden a diferentes time-frames de un mismo vídeo de una muestra no estimulada (control negativo), la flecha roja sigue el movimiento de una mitocondria. Barras de escala = 20um (imagen superior), 10um (imágenes inferiores).



3.3. Densidad mitocondrial axonal.

En primer lugar se evaluó si el contenido mitocondrial axonal variaba en las tres condiciones experimentales (control negativo, 24 horas de LPS, 24 horas de H₂O₂). Para ello, en todos los axones analizados se calculó el área mitocondrial total y se normalizó respecto a la longitud de cada axón. Se observó que la densidad mitocondrial axonal no cambia significativamente durante la neuroinflamación o durante el estrés oxidativo (figura 21).

Figura 21. Densidad mitocondrial axonal. En la gráfica se representan las medias \pm error estándar.

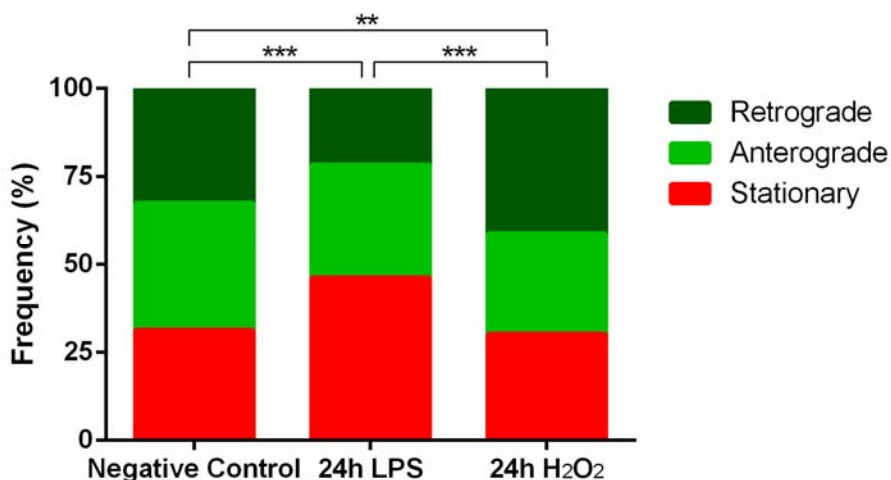


3.4. Distribución de mitocondrias móviles y estacionarias.

Se pueden distinguir dos poblaciones de mitocondrias axonales en relación a su transporte a través de los mismos: mitocondrias estacionarias y mitocondrias móviles (Shen & Cai, 2012; Hollenbeck & Saxton, 2005). En axones sanos, normalmente las mitocondrias estacionarias se sitúan en los nodos de Ranvier, lugar en el que los axones necesitan un mayor aporte energético por el intercambio iónico realizado para la transmisión saltatoria del impulso nervioso. Y las mitocondrias móviles se desplazan en sentido anterógrado (hacia el extremo distal del axón) o retrógrado (hacia el soma neuronal) moviéndose desde un sitio estacionario al siguiente.

Se realizó un análisis de la distribución de las poblaciones mitocondriales en las tres condiciones experimentales (figura 22). En el control negativo, un 31,3% de las mitocondrias eran estacionarias y el 68,7% restante eran mitocondrias móviles de las cuales el 36,1% se movían en sentido anterógrado y el 32,6% en sentido retrógrado. Con el estímulo neuroinflamatorio, aumenta la proporción de mitocondrias estacionarias hasta un 46,2%; mientras que, dentro de las mitocondrias móviles disminuye la proporción de las que se desplazan retrógradamente (21,6%), y algo menos las anterógradas (32,2%). Durante el estímulo con el H₂O₂, no varía mucho el porcentaje de mitocondrias estacionarias (30,2%); sin embargo; dentro de las mitocondrias móviles, aumenta mucho la proporción de mitocondrias que se desplazan retrógradamente (41,2%). En resumen, durante la neuroinflamación se reduce el transporte mitocondrial (anterógrado y retrogrado), mientras que durante el estrés oxidativo aumenta el transporte retrógrado al soma de las mitocondrias.

Figura 22. Distribución de las poblaciones de mitocondrias móviles y estacionarias. Se realizó un análisis de frecuencias mediante el test de χ^2 (chi-cuadrado).



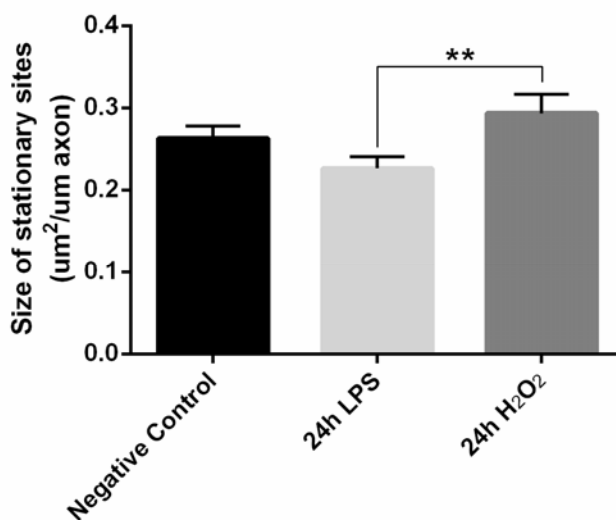
3.5. Comportamiento de las mitocondrias estacionarias.

Se consideraron como mitocondrias estacionarias los objetos cuyo desplazamiento era nulo durante el tiempo de grabación. En realidad, sería más correcto hablar de sitios de mitocondrias estacionarias, ya que la resolución del *Spinning disk* no permite distinguir si la señal procedente de un objeto sin movimiento corresponde a una o varias mitocondrias. Normalmente, en los nodos de Ranvier de un axón sano suelen acumularse varias mitocondrias.

Para evaluar el comportamiento de los sitios de mitocondrias estacionarias se calculó el área ocupada por los objetos que no se desplazaban durante el tiempo de grabación y se normalizó respecto a la longitud de cada axón (figura 23). El tamaño de los sitios de mitocondrias estacionarias tiende a disminuir un poco en los axones de un entorno neuroinflamatorio respecto al

control negativo, mientras que tiende a aumentar ligeramente en los axones sometidos a estrés oxidativo; pero en ningún caso las diferencias llegan a ser significativas. Existe una diferencia significativa en el tamaño de los sitios de mitocondrias estacionarias entre ambos estímulos.

Figura 23. Tamaño de los sitios de mitocondrias estacionarias.



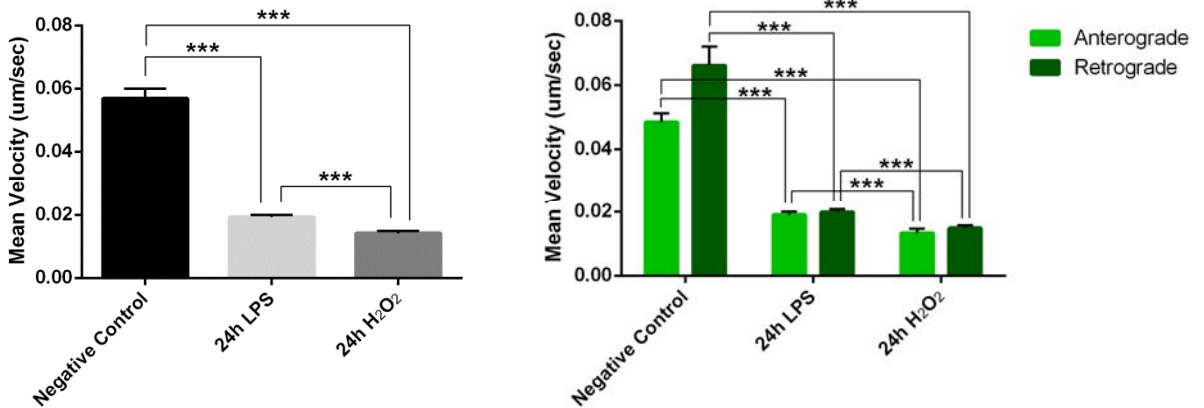
3.6. Comportamiento de las mitocondrias móviles.

Se consideraron como mitocondrias móviles aquellos objetos cuya velocidad de desplazamiento fuera mayor de cero en algún momento de la grabación. Las mitocondrias axonales pueden describir trayectorias muy diversas: desplazarse en la misma dirección durante toda su trayectoria, cambiar de dirección anterógrada a retrógrada y viceversa, moverse durante un tiempo y luego pararse, etc. Habitualmente atraviesan sitios de mitocondrias estacionarias, en cuyo caso, ante la imposibilidad de saber si se

trataba de la misma mitocondria, se separaron las trayectorias como pertenecientes a mitocondrias diferentes. Por todo ello, se consideró como parámetro más adecuado para estudiar el comportamiento de las mitocondrias móviles la velocidad media de la trayectoria de cada mitocondria móvil.

Se observó una disminución muy significativa de la velocidad media de las mitocondrias móviles de los axones en ambos estímulos respecto del control negativo sin estimular (figura 24). Si se distinguen las trayectorias del movimiento entre anterógrada y retrógrada, las diferencias no cambian, la disminución se produce en las velocidades medias de ambas direcciones.

Figura 24. Velocidad media de las mitocondrias axonales móviles.



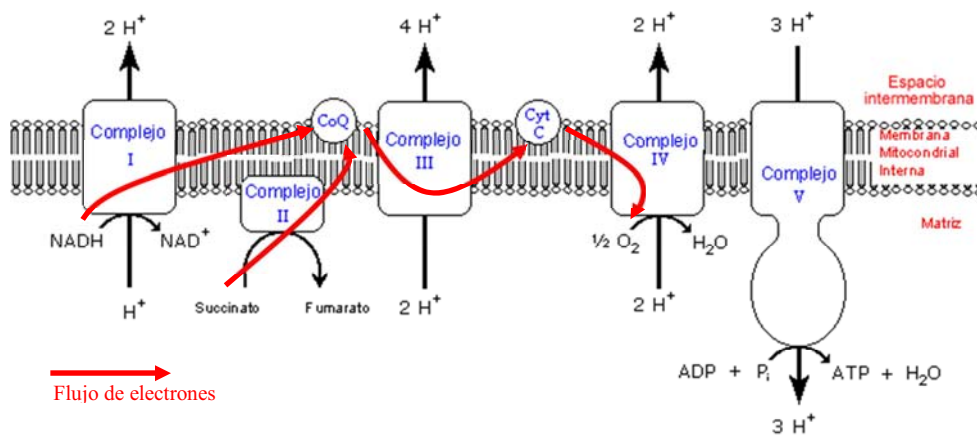
4. Función mitocondrial de los cultivos organotípicos en neuroinflamación (LPS) y estrés oxidativo (H₂O₂).

Para analizar la función mitocondrial en los cultivos organotípicos en distintas condiciones experimentales, se realizaron ensayos de respirometría utilizando el respirómetro Oxygraph-2k (Oroboros Instruments). Los ensayos se realizaron en homogeneizados de los cultivos de cerebelo, por lo que la medición de la función respiratoria se refiere al conjunto de mitocondrias del tejido (neuronal y glial). Se evaluó el estado de los complejos I y II en condiciones de neuroinflamación (24 horas de LPS) y de estrés oxidativo (24 horas de H₂O₂), y el estado del complejo IV en neuroinflamación (24 horas de LPS).

4.1. Ensayos de respirometría.

La respiración mitocondrial incluye dos procesos diferenciados: el transporte de electrones obtenidos a partir de la oxidación del NADH y el FADH₂ por medio de la cadena transportadora de electrones (integrada por los complejos I al IV) que genera un gradiente de protones en el espacio intermembrana, y la fosforilación oxidativa o síntesis de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (Pi) catalizada por la ATP sintasa (complejo V) que se sirve del gradiente electroquímico generado durante el transporte electrónico como fuerza motriz (figura 25).

Figura 25. Cadena respiratoria mitocondrial.



El protocolo utilizado para los ensayos de respirometría incluía la evaluación de diferentes estados respiratorios:

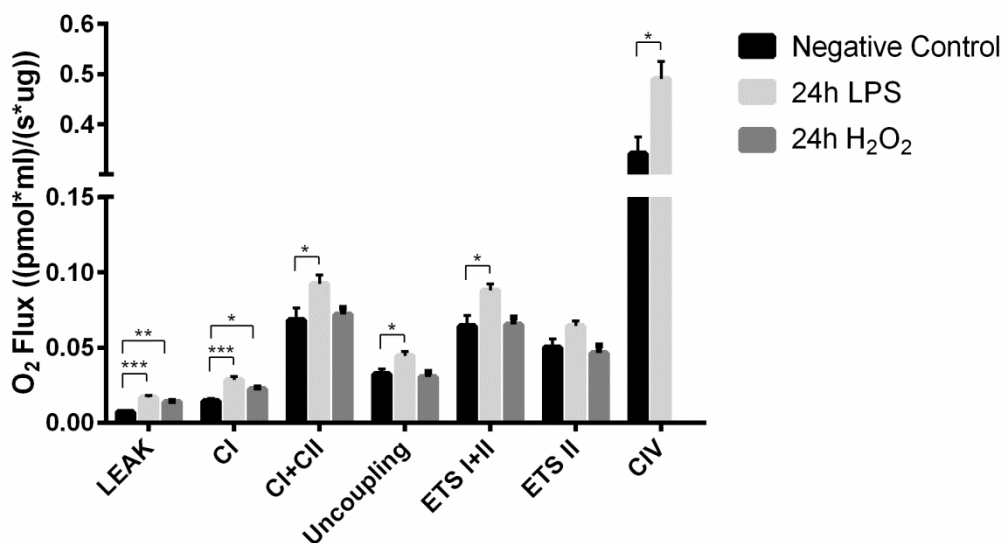
- *LEAK*: estado de respiración desacoplada de la actividad de la ATP sintasa, debido a la fuga de protones y al circuito de electrones iniciado tras la adición de malato y glutamato, sin la presencia de ADP.
- Complejo I (CI): estado respiratorio del complejo I NADH-dependiente tras la adición de ADP, donde el gradiente de protones del espacio intermembrana está siendo utilizado parcialmente por la ATP sintasa para la fosforilación oxidativa (respiración acoplada) y disipados también parcialmente debido a la fuga de protones (respiración desacoplada).
- Complejos I y II (CI+CII): medida de la respiración del complejo II FADH₂-dependiente junto a la respiración del complejo I, tras la adición de succinato.

- *Uncoupling*: respiración endógena desacoplada de la síntesis de ATP a través de sustratos de los complejos I y II, tras la adición de oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa).
- ETS I+II: medida de la capacidad máxima del sistema de transferencia de electrones mediante el desacoplamiento no fisiológico de la membrana interna mitocondrial tras la adición de FCCP (ionóforo o agente desacoplante que provoca la disipación de los H⁺).
- ETS II: respiración máxima que corresponde sólo al complejo II tras la adición de rotenona (inhibidor del complejo I).
- Complejo IV (CIV): estado respiratorio del complejo IV tras la inhibición del complejo III mediante antimicina, y la adición de ascorbato y TMPD.

Se observó que a las 24 horas de estimulación con LPS, el estado inicial de respiración desacoplada (LEAK) y la respiración NADH-dependiente del complejo I están aumentados muy significativamente. Sin embargo, no parece que la respiración del complejo II esté afectada ya que en el estado ETS II, tras inhibir el complejo I, no se observan diferencias significativas. Por último, la respiración del complejo IV también está aumentada significativamente (figura 26).

Tras 24 horas de estimulación con H₂O₂, se apreció un aumento significativo del estado inicial de respiración desacoplada (LEAK) y de la respiración NADH-dependiente del complejo I (figura 26).

Figura 26. Valores de respiración de los cultivos organotípicos de cerebelo en las distintas fases del protocolo SUIT. Valores normalizados por la cantidad de proteína total.



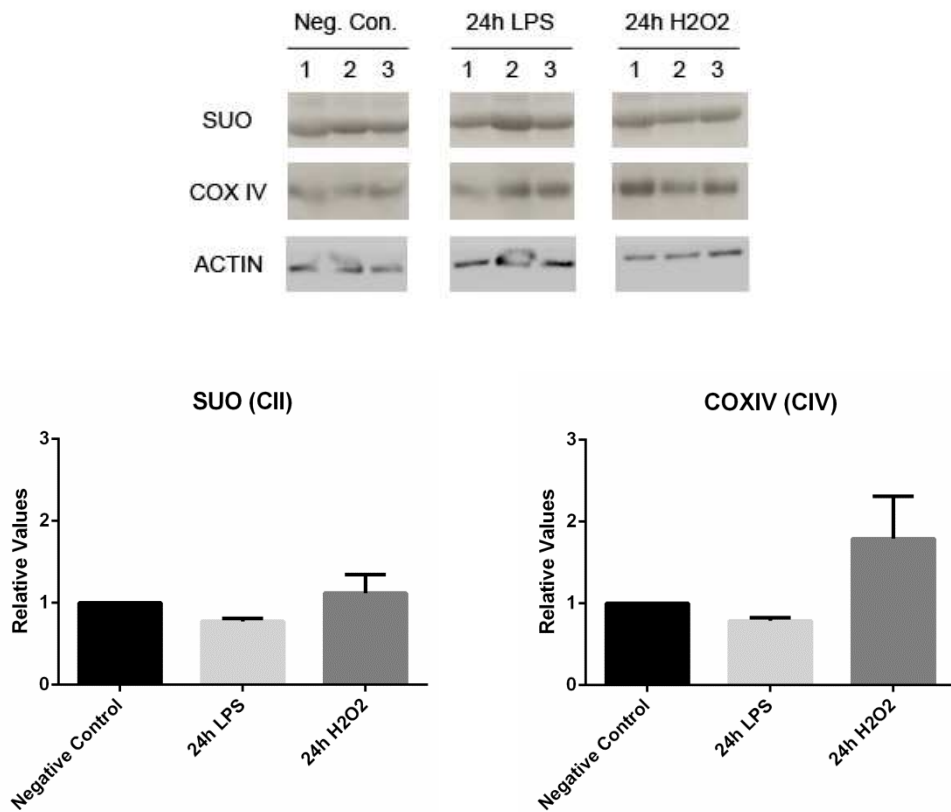
4.2. Cuantificación de complejos mitocondriales en los cultivos.

Para comprobar si el aumento de la respiración de algunos complejos mitocondriales se debía al aumento del contenido proteico de los complejos o por el contrario al aumento de su capacidad respiratoria, se analizaron por western blot dos proteínas pertenecientes a dos complejos mitocondriales diferentes: SUO (succinato ubiquinona oxidorreductasa) del complejo II y COX IV (subunidad IV de la citocromo c oxidasa) del complejo IV. El experimento se repitió 3 veces.

En ninguna de las condiciones experimentales (LPS o H₂O₂) varía significativamente la expresión de las proteínas SUO y COX IV (figura 27), por lo que se puede concluir que los cambios respiratorios observados mediante los

ensayos de respirometría no se deben a un aumento del contenido proteico de los complejos mitocondriales.

Figura 27. Cuantificación de la cantidad de proteínas SUO y COX IV en tres grupos experimentales. Estudios realizados por western blot. Valores normalizados por el control negativo.

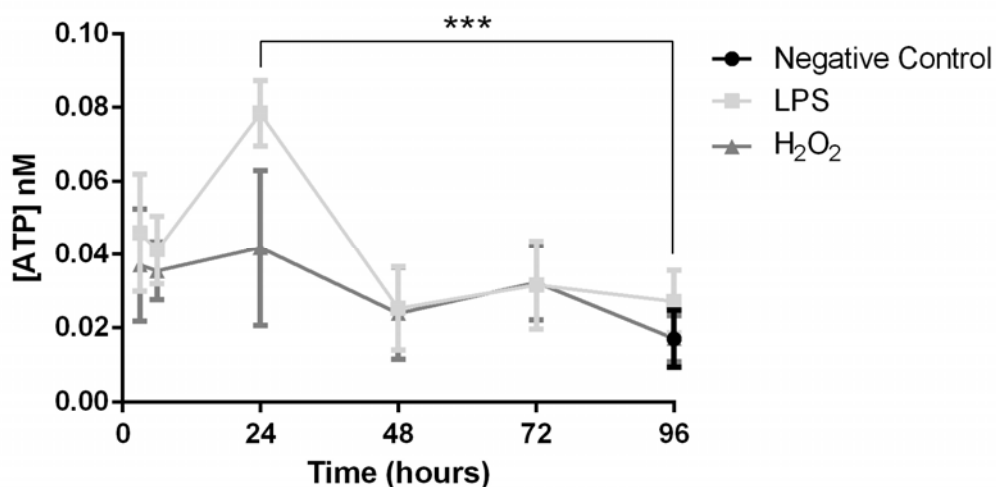


5. Cantidad de ATP producida por los cultivos organotípicos en neuroinflamación (LPS) y estrés oxidativo (H₂O₂).

Para comprobar si el aumento de la capacidad respiratoria de determinados complejos mitocondriales de los cultivos organotípicos de cerebelo se traducían en un aumento de la producción de ATP, se utilizó un kit comercial de Molecular Probes para medir la cantidad de ATP en los cultivos organotípicos de cerebelo estimulados con LPS o H₂O₂ a distintos tiempos de estimulación.

Efectivamente, a las 24 horas de estimulación con LPS, se observó un aumento muy significativo de la concentración de ATP de los cultivos respecto al control negativo, que no se observó en el resto de puntos temporales, ni en el estímulo con H₂O₂ (figura 28).

Figura 28. Producción de ATP en los cultivos organotípicos a distintos tiempos de estimulación. El control negativo se coloca a las 96 horas porque todas las muestras se recogieron al final del experimento tras permanecer los mismos días *in vitro*.



6. Resumen de los resultados.

En nuestro análisis de los cambios mitocondriales en respuesta a la neuroinflamación y al estrés oxidativo en los cultivos organotípicos de cerebelo, hemos observado:

- En neuroinflamación (estímulo 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS):
 - Morfología de las mitocondrias axonales:
 - Aumento de su tamaño (entre las 24 y las 72 horas de estimulación).
 - No cambian su aspecto, no son más redondeadas o planas. AR en torno a 3.
 - Aumento de la complejidad de las crestas mitocondriales a lo largo de todo el estímulo.
 - Transporte de mitocondrias axonales:
 - No hay cambios en la densidad mitocondrial intra-axonal.
 - Aumenta la proporción de mitocondrias estacionarias frente a móviles.
 - Disminuye ligeramente el tamaño de los sitios estacionarios, no llega a ser significativo respecto al control negativo, pero sí respecto al estímulo con H_2O_2 .
 - Drástica disminución de la velocidad media de las mitocondrias móviles, tanto en sentido anterógrado como en sentido retrógrado.
 - Estado respiratorio de las mitocondrias del tejido nervioso:
 - Aumentan la respiración inicial desacoplada de la ATP sintasa, la respiración NADH-dependiente del CI y la respiración del CIV.
 - No hay cambios en la expresión de CII y CIV.
 - Producción de ATP en el tejido nervioso:
 - Aumenta muy significativamente a las 24 horas de estimulación.

➤ En estrés oxidativo (estímulo 500 μM H_2O_2):

- Morfología de las mitocondrias axonales:
 - Aumento de su tamaño a las 24 horas de estimulación.
 - No cambia su aspecto, pero sus valores de AR fluctúan más que con el estímulo del LPS (entre valores de 2,14 y 3,34).
 - Aumento de la complejidad de las crestas mitocondriales a lo largo de todo el estímulo.
- Transporte de mitocondrias axonales:
 - No hay cambios en la densidad mitocondrial intra-axonal.
 - No varían las proporciones de mitocondrias estacionarias y móviles, pero dentro de las móviles aumenta la proporción de mitocondrias que se desplazan retrógradamente hacia el soma.
 - Drástica disminución de la velocidad media de las mitocondrias móviles, incluso más que con el LPS.
- Estado respiratorio de las mitocondrias del tejido nervioso:
 - Aumentan la respiración inicial desacoplada de la ATP sintasa y la respiración NADH-dependiente del CI, pero en menor medida que con el estímulo del LPS.
 - No hay cambios en la expresión de CII y CIV.
- Producción de ATP en el tejido nervioso:
 - No aumenta, ni disminuye, respecto al control negativo.

Estos resultados reflejan que en ambas situaciones de estrés las mitocondrias del tejido nervioso responden a corto plazo aumentando su capacidad respiratoria (y también la producción de ATP en neuroinflamación), pero el transporte mitocondrial axonal se ve francamente alterado. Por tanto, nuestro estudio postula que el transporte mitocondrial en los axones es muy sensible al daño inflamatorio agudo y oxidativo, siendo crítico en la generación

de daño mitocondrial, y podría constituir una diana terapéutica adecuada para prevenir el daño axonal en enfermedades neuroinflamatorias o neurodegenerativas.



VII. DISCUSIÓN

1. Modelo de neuroinflamación en cultivos organotípicos de cerebelo murino.

El principal objetivo de este estudio era analizar distintos aspectos de la biología mitocondrial y de su función respiratoria y energética relacionados con la degeneración axonal en una situación de inflamación aguda. Para ello se escogieron los cultivos organotípicos de cerebelo de ratón por diversas razones. En primer lugar, estos cultivos son fáciles de preparar, pueden sobrevivir *in vitro* varias semanas y son muy accesibles para realizar estudios moleculares de precisión y técnicas de imagen *in vivo* (Gähwiler *et al.*, 1997). En comparación con los cultivos primarios de determinados tipos celulares, los cultivos organotípicos poseen todos los tipos celulares que forman parte del sistema nervioso central y que participan en un proceso neuroinflamatorio y neurodegenerativo: neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y microglía.

Además, los cultivos organotípicos de cerebelo contienen una gran cantidad de axones mielinizados (en comparación con cultivos de hipocampo por ejemplo) y sufren una degeneración axonal limitada tras el proceso de corte (los cultivos organotípicos de médula espinal sufren mayor degeneración axonal). Después de su preparación, se mantienen 7 días *in vitro* para permitir que degeneren aquellos axones que hayan sido transectados con el cortador de tejido, y también para permitir una mayor mielinización de un tejido todavía en desarrollo (se extrae de ratones con 7 días de edad) y reducir la activación microglial asociada al proceso de corte del tejido. Precisamente porque ya hay un nivel basal de activación microglial por el proceso de preparación de los cultivos, tras los 7 DIV, todos los cultivos tanto los estimulados como los controles negativos, se han recogido al final de cada experimento, manteniéndose los mismos DIV totales.

Respecto a los estímulos utilizados, nuestro objetivo era simular un entorno inflamatorio agudo similar al que se establece en las lesiones o placas agudas que sufren los pacientes de esclerosis múltiple en las primeras etapas de la enfermedad, cuando se observa un alto grado de daño y transección axonal (Trapp *et al.*, 1998). Es importante estudiar y comprender los mecanismos que subyacen al daño axonal en estas fases de la enfermedad, para intentar frenar este daño que se va acumulando en el transcurso de los años y acaba provocando grandes déficits neurológicos en fases más crónicas de la enfermedad. Los principales mecanismos en esta fase aguda e inflamatoria de la enfermedad son las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno producidas por microglía y macrófagos activados por la respuesta inflamatoria. Para reproducir estos mecanismos, el objetivo del modelo es inducir activación proinflamatoria de la microglía (M1) que produce citoquinas proinflamatorias y estrés oxidativo.

El modelo de neuroinflamación *in vitro*, mediante la estimulación con LPS (15 µg/ml) de los cultivos organotípicos de cerebelo, induce la activación de la microglía a través de sus receptores TLR4 (Chao *et al.*, 1992; Lehnardt *et al.*, 2002) con aumento de la expresión de iNOS (figura 10A y 10C). El aumento de iNOS en los cultivos conlleva un aumento en la producción de ROS. Las mitocondrias del tejido inflamado son las principales productoras de ROS ya que el NO elevado se une al sitio de unión del O₂ de la citocromo C oxidasa (complejo IV mitocondrial) impidiendo el correcto transporte de los electrones y su salida de la cadena para producir diversas especies reactivas de oxígeno. De hecho, observamos un aumento de ROS a partir de las 12 horas de estimulación con LPS, que se mantiene en niveles significativamente más altos que los del control negativo hasta las 96 horas de estimulación con LPS (figura 10B).

Por otro lado, el proceso inflamatorio es evidente dados los altos niveles de citoquinas proinflamatorias en los sobrenadantes de los cultivos a lo largo del tiempo de estimulación con LPS (figura 11). Por tanto, estamos recreando un entorno inflamatorio y oxidativo, y los axones presentes en este entorno sufren desmielinización (figuras 7 y 8) y daño axonal (figura 9). Los axones de los cultivos organotípicos de cerebelo estimulados con LPS comienzan a perder su envoltura mielínica a las 12 horas de estimulación, de forma que a las 24 horas hay un 30% menos de axones mielinizados respecto del control negativo (figura 7). Como consecuencia del estrés oxidativo y la inflamación, los axones de los cultivos comienzan a dañarse lo que se demuestra por el aumento de neurofilamentos no-fosforilados (figura 9) y la presencia de bulbos axonales (figura 7) indicativos de la alteración del transporte axonal, que posteriormente se comentará a la luz de los resultados obtenidos en los experimentos de motilidad mitocondrial (sección 3 del apartado de resultados).

Ya que el estrés oxidativo parece ser uno de los efectores patogénicos más importantes dentro de la neuroinflamación aguda, tanto en nuestro modelo como en la patogénesis de las lesiones inflamatorias agudas de pacientes con EM (Bö *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2001; Smith y Lassmann, 2002; Brown y Borutaite, 2002), decidimos incluir un estímulo específico de estrés oxidativo, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 500 μM). Así podemos observar qué parte de la respuesta mitocondrial frente a la neuroinflamación se corresponde sólo con el daño producido por el estrés oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno son uno de los elementos más dañinos para las mitocondrias en un entorno inflamatorio ya que interfieren en la correcta transmisión de los electrones a través de los complejos mitocondriales del I al IV, provocando la salida de los mismos de la cadena y su

disponibilidad para crear más ROS. El H_2O_2 es una de las moléculas que forma parte de las especies reactivas de oxígeno y la concentración utilizada excede la capacidad de las peroxidasas celulares para neutralizarlo.

En la publicación Di Penta *et al.*, 2013 (Anexo 1), estudiamos el efecto del H_2O_2 en los cultivos organotípicos de cerebelo administrado durante 24 horas a una concentración de 1mM. Se observó disminución del porcentaje de axones mielinizados y de la expresión de la enzima CNPasa, aumento del número de neurofilamentos desfosforilados y aumento de la enzima iNOS y de la producción de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, se comprobó que para tiempos más largos de estimulación, esta concentración era demasiado tóxica (figura 12) y por ello se redujo a 500 μ M para nuestro estudio de la biología mitocondrial.

Por último, se eligió uno de los puntos temporales utilizados para la caracterización del modelo (de 1 a 96 horas de estimulación) a la hora de realizar los experimentos de transporte mitocondrial axonal (apartado 3 de la sección de resultados), ya que si se utilizaban todos los puntos temporales se obtenían demasiadas horas de grabación para ser analizadas; y de los ensayos de respirometría (apartado 4 de la sección de resultados) porque se necesitaban demasiados cortes de cerebelo, lo cual hubiera incrementado enormemente el número de ratones utilizados. Así pues, se eligió un punto temporal en el que la inflamación y el estrés oxidativo fueran evidentes, y la desmielinización y el daño axonal estuvieran ya establecidos; por ello se escogió el punto de 24 horas de estimulación.

2. Respuesta de las mitocondrias axonales a la inflamación aguda y al estrés oxidativo.

Para analizar correctamente los resultados obtenidos acerca de la respuesta mitocondrial a la neuroinflamación y al estrés oxidativo, hay que tener en cuenta una limitación de las técnicas utilizadas, ya que no con todas ellas se podía acceder a las mitocondrias axonales. Los estudios de morfología y transporte se refieren exclusivamente a mitocondrias axonales, mientras que los estudios de la función mitocondrial y la medida de ATP se refieren a todas las mitocondrias del tejido, sin distinción del tipo celular al que pertenecen. Por ello, no deben sacarse conclusiones cruzadas cometiendo el error de interpretar todos los resultados juntos, analizándose primero la respuesta de las mitocondrias axonales a los estímulos de neuroinflamación y estrés oxidativo, y posteriormente la respuesta funcional de las mitocondrias del tejido.

La primera observación destacable de las mitocondrias axonales es su aumento de tamaño frente a ambos estímulos (figura 14), siendo mayor con el LPS. Las mitocondrias controlan su morfología mediante los procesos integrantes de la denominada dinámica mitocondrial: fusión y fisión mitocondrial. Este aumento de tamaño sugiere que las mitocondrias axonales están llevando a cabo procesos de fusión, que permiten el intercambio de componentes mitocondriales en situaciones en las que estén resultando dañadas (Detmer y Chan, 2007). Presumiblemente, ante la situación de altos niveles de ROS a la que están sometidas las mitocondrias de nuestro modelo neuroinflamatorio (que daña componentes de la cadena transportadora de electrones), éstas responden fusionándose, intercambiando componentes entre mitocondrias dañadas y mitocondrias sanas para mantener una población de mitocondrias funcionales. Esta predicción a partir de nuestros

resultados requiere ser verificada en futuros estudios de fusión y fisión mitocondrial.

Además de la reorganización morfológica externa, ante la neuroinflamación y el estrés oxidativo, las mitocondrias axonales también están llevando a cabo procesos de reorganización interna. La complejidad de las crestas mitocondriales aumenta muy significativamente en ambos estímulos (figura 16). Se ha demostrado que la estructura de la membrana mitocondrial interna está ligada al estado metabólico de la mitocondria (Cogliati *et al.*, 2013), y que en estados respiratorios más activos (con altas concentraciones de ATP) las mitocondrias adoptan una morfología “condensada”, con una gran cantidad de crestas (Mannella, 2006). Nuestros resultados sugieren que las mitocondrias están respondiendo ante las necesidades metabólicas aumentadas de axones dañados tanto por neuroinflamación como por estrés oxidativo. Para confirmar esta predicción, será necesario realizar nuevos experimentos aislando las mitocondrias axonales de los cultivos organotípicos de cerebelo, y analizando la expresión de la proteína OPA1 encargada de la reorganización de la membrana mitocondrial externa (Olichon *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2003).

La forma de las mitocondrias axonales no sufre cambios destacables ante los distintos estímulos (figura 15), se mantienen con una conformación más bien alargada muy habitual en axones. En un estudio previo en el que utilizaron ratones inmunizados con MOG (Nikić, *et al.*, 2011) observaron mitocondrias redondeadas e hinchadas en axones que sufrían un proceso degenerativo antes de producirse la desmielinización de los mismos. Sin embargo, estas observaciones las realizaron tras la aparición de los primeros síntomas clínicos de la EAE, una fase más avanzada de la que simula nuestro modelo neuroinflamatorio.

El contenido mitocondrial axonal se midió en las grabaciones de los experimentos de transporte mitocondrial axonal. No se observaron cambios en la densidad mitocondrial axonal durante la neuroinflamación, y se observó un pequeño descenso no significativo durante el estrés oxidativo (figura 21). A pesar de que en axones desmielinizados de lesiones crónicas se haya observado un aumento del contenido mitocondrial axonal (Zambonin et al.), en nuestro modelo neuroinflamatorio que simula una situación de inflamación aguda todavía no se ha llegado a alterar el contenido mitocondrial axonal.

Los cambios morfológicos sugieren que las mitocondrias axonales están tratando de responder a las necesidades metabólicas de los axones expuestos a neuroinflamación y a estrés oxidativo. Sin embargo, el transporte de las mismas a través de los axones está claramente alterado en ambas situaciones. Durante la neuroinflamación, las mitocondrias axonales parecen paralizarse: aumenta la proporción de mitocondrias estacionarias (aunque el tamaño medio de los sitios estacionarios tiene una tendencia no significativa a disminuir) y disminuye drásticamente la velocidad media de transporte de las mitocondrias móviles, tanto en sentido anterógrado como en sentido retrógrado. Durante el estímulo de estrés oxidativo, las alteraciones son parecidas, la velocidad media de transporte es aún más baja (también en ambos sentidos), pero aumenta la proporción de mitocondrias que se mueven (aunque lentamente) en sentido retrógrado. Estas diferencias entre ambos estímulos indican que el estímulo del H_2O_2 induce más daño en las mitocondrias, y una mayor proporción de las mismas inician el transporte retrógrado de vuelta al soma para ser degradadas.

Sin embargo, otro estudio reciente muestra resultados diferentes respecto al transporte axonal de mitocondrias. En dicho estudio utilizaban un modelo *in vitro* de desmielinización (co-cultivos de neuronas de la raíz del

ganglio dorsal y células de Schwann tratados con lisolecitina). La desmielinización provocaba un aumento de la velocidad de las mitocondrias móviles, tanto anterógradas como retrógradas (Kiryu-Seo *et al.*, 2010). Es necesario remarcar que ambos modelos son muy diferentes. En el nuestro se induce inflamación mediante LPS en cultivos organotípicos, mientras que en la publicación de Kiryu-Seo *et al.* utilizaban co-cultivos de neuronas y células de Schwann (sin contar con otros tipos celulares como microglía y astrocitos) en los que provocaban una desmielinización química mediante lisolecitina. A pesar de que en nuestro modelo neuroinflamatorio se produce una desmielinización significativa, esta desmielinización es consecuencia del entorno inflamatorio creado por la activación microglial a través del LPS. Es decir, el transporte mitocondrial axonal puede que sea uno de los primeros aspectos que fallan de la biología mitocondrial en un ataque inflamatorio agudo, antes incluso de que la desmielinización se produzca. En este sentido hay observaciones patológicas en cerebros de pacientes con EM con lesiones agudas que sugieren que este fenómeno de daño axonal con preservación de mielina acontece realmente (Brück, 2005).

Dentro de las posibles causas de este fallo del transporte mitocondrial axonal pueden estar la desestructuración del citoesqueleto axonal por la degeneración o el fallo de la maquinaria de transporte (proteínas motoras y adaptadoras, y procesos de fusión y fisión). En otras enfermedades neurodegenerativas también se ven alteradas proteínas implicadas en el transporte de las mitocondrias a través de los axones. Por ejemplo, mutaciones en las proteínas PINK1 y Parkin, que están implicadas en los procesos de fusión-fisión y en la iniciación del proceso de mitofagia, causan formas hereditarias de la enfermedad de Parkinson (Scarffe *et al.*, 2014). La proteína huntingtina mutante causante de la enfermedad de Huntington, altera el ensamblaje y la

función de los complejos encargados de la fusión y la fisión mitocondrial (Bossy-Wetzel et al., 2008). En muestras *postmortem* de pacientes con enfermedad de Alzheimer, se han observado niveles reducidos de Drp1, OPA1, Mfn1, Mfn2 y niveles elevados de FIS1, provocando una alteración de la dinámica mitocondrial en favor de la fisión.

Como consecuencia de esta paralización del transporte axonal, las mitocondrias no pueden alcanzar las zonas axonales donde son requeridas para aportar la energía en respuesta a los cambios por desmielinización y daño axonal. Además, en los cultivos tratados con LPS observamos un descenso de la proporción de mitocondrias que se mueven en sentido retrógrado, lo que puede suponer un fallo de los sistemas de degradación de mitocondrias dañadas que se encargan de mantener una población axonal de mitocondrias sanas y funcionales.

3. Respuesta de las mitocondrias del tejido a la inflamación aguda y al estrés oxidativo.

Para el estudio de la función respiratoria mitocondrial y la producción de ATP se utilizaron técnicas que requerían la homogenización del tejido por lo que los resultados obtenidos no se pueden interpretar como neuronales o axonales, sino como pertenecientes a todo el tejido sin distinguir el tipo celular. Por tanto, hay que tener en cuenta que la proporción de mitocondrias procedentes de la glía es muy significativo, y el papel fundamental de la glía es evitar el estrés y el daño, y proteger a las neuronas.

Nuestros resultados muestran en el entorno neuroinflamatorio el aumento de la respiración inicial desacoplada de la síntesis de ATP mediante el complejo V, el incremento de la respiración del complejo I (NADH-dependiente) una vez se acopla la síntesis de ATP al circuito por la adición de ADP y finalmente el aumento de la respiración del complejo IV. Al comprobar si esto se debía a un aumento de la expresión de los distintos complejos mitocondriales, no observamos dicho aumento, por lo que las mitocondrias realmente están aumentando la capacidad respiratoria de los complejos I y IV para responder a la demanda energética de los distintos tipos celulares durante la neuroinflamación. De hecho, este aumento de la capacidad respiratoria de los complejos mitocondriales a las 24 horas de estimulación se corresponde con un aumento significativo de la producción de ATP, disponible para las diversas necesidades energéticas del tejido.

Con el estímulo de estrés oxidativo con H_2O_2 , observamos un aumento algo menor de la capacidad respiratoria del complejo I. La respiración del complejo IV no pudo ser evaluada. Sin embargo, la producción de ATP no llega a aumentar significativamente en ningún momento del estímulo, aunque los

niveles a las 24 horas sean algo mayores que los niveles de ATP del control negativo.

En definitiva, las mitocondrias del tejido aumentan la capacidad respiratoria de algunos de sus complejos como respuesta a ambos estímulos, aunque de forma más discreta en estrés oxidativo, lo que se traduce en un menor aumento de la producción de ATP en el tejido.

4. Comparación de la respuesta mitocondrial en neuroinflamación y en estrés oxidativo.

Cuando se comparan ambos estímulos y fijándonos en la respuesta de todas las mitocondrias del tejido, éstas aumentan más su capacidad respiratoria y su producción de ATP durante la neuroinflamación que durante el estrés oxidativo. Probablemente el estímulo del peróxido de hidrógeno produzca un daño más directo sobre las mitocondrias que el LPS. El LPS produce las citoquinas proinflamatorias y el estrés oxidativo a través de la activación de la microglía, mientras que el H_2O_2 , por ser una especie reactiva de oxígeno, daña directamente a los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Por ello, las mitocondrias del tejido estimulado con H_2O_2 , tienen una menor capacidad de respuesta y de producción de ATP.

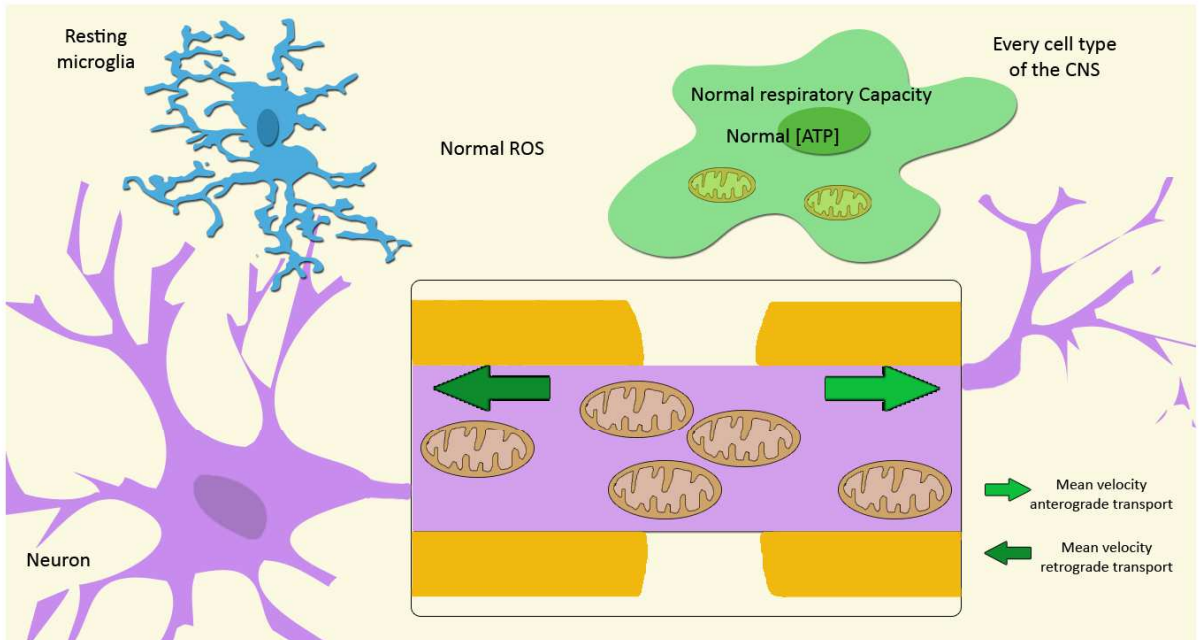
En cuanto al comportamiento de las mitocondrias axonales, ambos estímulos convergen claramente en un punto: la disfunción del transporte mitocondrial axonal. En ambos estímulos, las mitocondrias axonales se paralizan, disminuyendo drásticamente la velocidad media de las mitocondrias móviles, tanto en sentido anterógrado como en sentido retrógrado. Esto implica que en una situación de neuroinflamación aguda, el estrés oxidativo será el agente patogénico principal causante del fallo del transporte mitocondrial axonal.

Todas estas observaciones nos llevan a proponer el siguiente modelo de la respuesta mitocondrial en un entorno neuroinflamatorio agudo (figura 29): mientras que a nivel tisular las mitocondrias responden aumentando su capacidad respiratoria y la producción de ATP, a nivel axonal las mitocondrias responden morfológicamente a la inflamación aumentando su tamaño y la complejidad de sus crestas mitocondriales, pero su transporte se ve

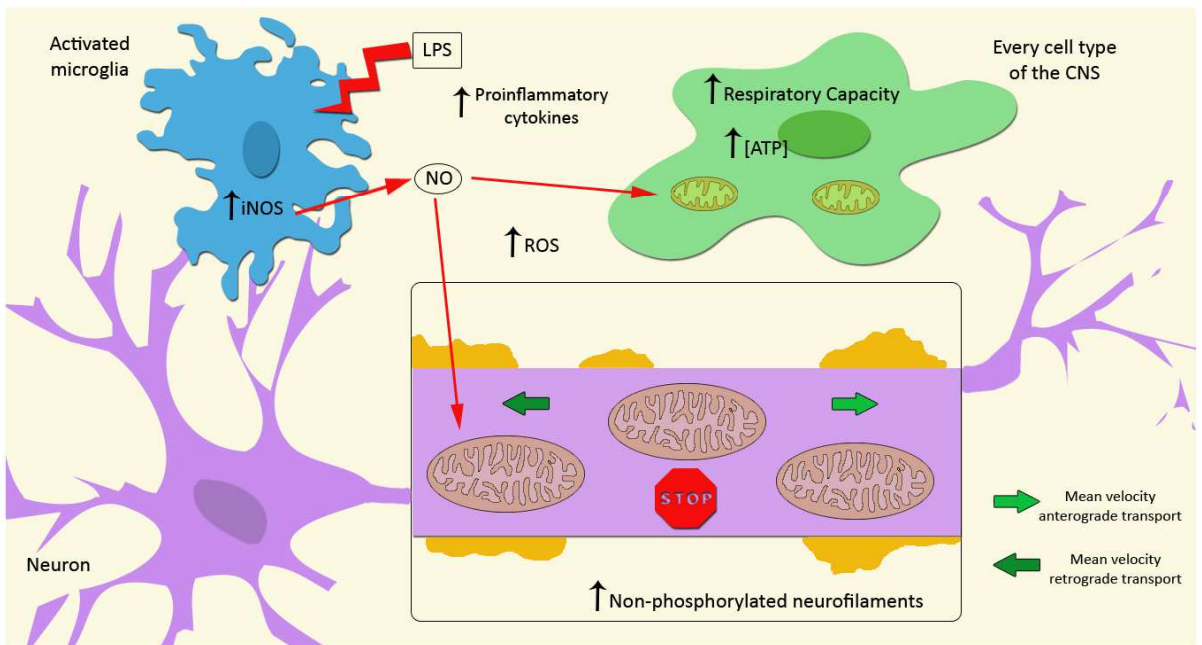
completamente alterado. La paralización de las mitocondrias se produce en una etapa temprana y aguda de la inflamación, antes de que los daños axonales sean irreversibles. Por tanto, nuestro modelo indica que el mecanismo más crítico en la disfunción mitocondrial en la neuroinflamación aguda es la alteración del transporte axonal de mitocondrias (especialmente el retrógrado). Por tanto, nuestro estudio sugiere la preservación del transporte mitocondrial como una diana terapéutica de neuroprotección en lesiones agudas de EM.

Figura 29. Modelo de respuesta mitocondrial a la neuroinflamación aguda.

Healthy tissue



Acute inflammation



5. Limitaciones del estudio.

La primera limitación con la que nos encontramos en el estudio es que el modelo empleado reproduce algunos de los aspectos del daño axonal en neuroinflamación, pero no todos. Se trata de un modelo de neuroinflamación *in vitro*, en el que el estímulo con LPS recrea correctamente un entorno inflamatorio pero en el que carecemos del sistema inmune del organismo. Siempre es mejor y más completo utilizar un modelo animal, pero en este caso ciertas técnicas como la microscopía *in vivo* para el estudio de la motilidad mitocondrial axonal requeriría el uso de animales transgénicos como los utilizados en el trabajo de Nikić *et al.* (2011) con distintos tipos celulares, o incluso estructuras subcelulares, marcados fluorescentemente; concretamente neuronas para visualizar los axones, células T, macrófagos-microglía y mitocondrias.

Siguiendo con las limitaciones relativas a las técnicas utilizadas, algunas de ellas (concretamente los ensayos de respirometría y medida de ATP para evaluar la función mitocondrial) no permitían analizar en exclusiva las mitocondrias axonales. El tejido debía ser homogeneizado, con lo cual se midió la función mitocondrial de todo el tejido, mientras que los datos de morfología y transporte son de mitocondrias únicamente axonales. El aumento de la complejidad de las crestas de las mitocondrias axonales probablemente se corresponda con un aumento de la capacidad respiratoria de sus complejos. Aunque veamos un aumento en la capacidad de los complejos I y IV, todas las mitocondrias del tejido están contribuyendo al mismo, probablemente las mitocondrias neuronales también, aunque serían necesarios nuevos estudios para demostrarlo.

Por otro lado, no se han podido realizar los experimentos que evalúan el transporte mitocondrial axonal y los que evalúan la función mitocondrial en todos los puntos temporales utilizados para la caracterización del modelo, por razones operativas. Esto nos lleva a preguntarnos en qué momento se produce la paralización del transporte ¿puede que sea incluso antes de las 12-24 horas en las que empezamos a ver desmielinización y daño axonal? ¿Esta paralización se mantendrá a lo largo de las 96 horas de estudio? Y respecto a los ensayos de respirometría, como se ve un aumento de la producción de ATP significativo sólo a las 24 horas de estimulación con LPS y posteriormente baja, si evaluásemos la capacidad respiratoria de las mitocondrias en tiempos más largos ¿disminuiría?

En los ensayos de respirometría, no se han podido mostrar los resultados obtenidos para el complejo IV con el estímulo del H_2O_2 por un fallo en la adición de los reactivos del protocolo SUIT. Probablemente hubiéramos visto también un aumento de la capacidad respiratoria de dicho complejo, pero esta vez asociada a un aumento relativo (no llega a ser significativo) del contenido proteico de complejos dentro de las mitocondrias (figura 27).

Finalmente, para comprobar si el aumento de la respiración de algunos complejos mitocondriales se debía al aumento del contenido proteico de los complejos, se decidió estudiar mediante western blot dos de los tres complejos evaluados en los ensayos de respirometría (el II y el IV) ya que normalmente sube la expresión de todos los complejos integrantes de la cadena respiratoria mitocondrial de forma coordinada (en respuesta a las necesidades metabólicas del tejido). Sin embargo, en el estudio no se ha incluido el complejo I que hubiese ofrecido información adicional.

A pesar de las limitaciones encontradas a lo largo del estudio, los resultados sugieren que la activación microglial y el estrés oxidativo inducen un incremento inicial de la función mitocondrial, pero al mismo tiempo también inducen el fallo del transporte mitocondrial axonal. Este fallo podría ser el mecanismo inicial y crítico del daño axonal en neuroinflamación aguda.

Para confirmar estos hallazgos y profundizar más en las causas harían falta más estudios centrados en dos puntos:

1. Saber si el fallo del transporte mitocondrial axonal es un evento temprano de la disfunción mitocondrial en la degeneración axonal por neuroinflamación, y ocurre tal y como parece en este estudio, incluso antes de que la desmielinización y el daño axonal se extiendan.
2. Identificar las causas moleculares del fallo del transporte mitocondrial axonal.

En relación con este segundo punto, sería necesario estudiar todos los elementos que forman la maquinaria de transporte axonal:

- El citoesqueleto axonal, principalmente los microtúbulos. ¿Están sufriendo una desestructuración? ¿Se están despolarizando?
- Proteínas transportadoras (kinesinas y dineínas), adaptadoras (Miro y TRAK) y de anclaje (sintafilina). En *Drosophila* se sabe que dMiro y Milton (homólogas de Miro y TRAK) están reguladas por los niveles de calcio intracelular, provocando la parada del transporte de las mitocondrias axonales cuando los niveles de calcio son elevados (Wang y Schwarz, 2009; Macaskill *et al.*, 2009).
- Proteínas de la dinámica mitocondrial encargadas de los procesos de fusión (Mitofusinas y OPA1) y de fisión (DRP1, FIS1 y MFF).

Todos estos procesos de transporte están al mismo tiempo muy relacionados con los mecanismos de control de la calidad mitocondrial (Fischer *et al.*, 2012) que permiten la fusión de mitocondrias para el intercambio de componentes dañados por componentes funcionales, la fisión que parece ser un evento anterior a la degradación de las mitocondrias irreversiblemente dañadas, y el transporte retrógrado de las mitocondrias dañadas hacia el soma para ser degradadas y completar el proceso de la mitofagia. Como ya se ha comentado anteriormente, las proteínas Parkin y PINK1 implicadas en procesos de fusión-fisión y mitofagia, permitiendo la renovación de la población de mitocondrias neuronales, sufren mutaciones en formas hereditarias de la enfermedad de Parkinson (Scarffe *et al.*, 2014). En nuestro modelo de degeneración axonal por neuroinflamación, una de las primeras consecuencias del fallo del transporte mitocondrial será la alteración de los procesos que regulan el control de calidad mitocondrial. De hecho, la proporción de mitocondrias que se desplaza en sentido retrógrado en los cultivos estimulados con LPS disminuye significativamente (figura 22).

Si se consigue identificar qué está fallando, tendremos una diana terapéutica perfecta para revertir el daño axonal temprano en neuroinflamación, que finalmente resulta en degeneración axonal y en fases más crónicas de enfermedades como la esclerosis múltiple en acumulación de déficits neurológicos en los pacientes.



VIII. CONCLUSIONES

Nuestro estudio ha identificado un aspecto de la biología mitocondrial axonal que falla en un entorno de neuroinflamación aguda, probablemente causado por el estrés oxidativo: la paralización del transporte mitocondrial axonal. Esta conclusión se basa en los siguientes hallazgos:

1. Tras el estímulo neuroinflamatorio las mitocondrias axonales aumentan de tamaño y poseen una mayor superficie de crestas, sugiriendo una respuesta encaminada a aumentar la producción de energía (ATP).
2. El transporte axonal de mitocondrias se altera de forma clara tanto en respuesta a la neuroinflamación como al estrés oxidativo. El fallo del transporte impide que la respuesta mitocondrial compensatoria aporte la energía necesaria en los sitios de daño axonal y por tanto contribuya al daño axonal o incluso sea su causante.
3. En respuesta a la neuroinflamación aumentan la respiración inicial desacoplada de la ATP sintasa, la respiración NADH-dependiente del CI y la respiración del CIV, sin cambios en la expresión de CII y CIV.
4. Los cambios en la función mitocondrial durante la neuroinflamación tienen como consecuencia una mayor producción de ATP en el tejido (aunque esto no quiere decir que no pueda haber un déficit de ATP en los axones).

Un estudio más profundo de los mecanismos de transporte axonal durante la neuroinflamación aguda permitirá identificar posibles dianas terapéuticas que sirvan para frenar el daño axonal agudo en pacientes de EM y de otras enfermedades neurodegenerativas en las que también interviene la inflamación.



IX. BIBLIOGRAFÍA

Ames, A. CNS energy metabolism as related to function. *Brain research. Brain research reviews* 34, 42–68 (2000).

Austin, S. & St-Pierre, J. PGC1 α and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *Journal of cell science* 125, 4963–71 (2012).

Babcock, D. F., Herrington, J., Goodwin, P. C., Park, Y. B. & Hille, B. Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *The Journal of cell biology* 136, 833–44 (1997).

Bakshi, R. *et al.* MRI in multiple sclerosis: current status and future prospects. *Lancet neurology* 7, 615–25 (2008).

Beckman, J. S. & Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology* 271, C1424–37 (1996).

Beecham, A. H. *et al.* Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature genetics* 45, 1353–60 (2013).

Berthold, C. H., Fabricius, C., Rydmark, M. & Andersén, B. Axoplasmic organelles at nodes of Ranvier. I. Occurrence and distribution in large myelinated spinal root axons of the adult cat. *Journal of neurocytology* 22, 925–40 (1993).

Bjartmar, C., Kidd, G., Mörk, S., Rudick, R. & Trapp, B. D. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Annals of neurology* 48, 893–901 (2000).

Bjartmar, C., Kinkel, R. P., Kidd, G., Rudick, R. A. & Trapp, B. D. Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology* 57, 1248–52 (2001).

Bö, L. *et al.* Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Annals of neurology* 36, 778–86 (1994).

Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology* 2, 907–16 (2001).

Bossy-Wetzel, E., Petrilli, A. & Knott, A. B. Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends in neurosciences* 31, 609–16 (2008).

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–54 (1976).

Bristow, E. A., Griffiths, P. G., Andrews, R. M., Johnson, M. A. & Turnbull, D. M. The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Archives of ophthalmology* 120, 791–6 (2002).

Brown, G. C. & Borutaite, V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free radical biology & medicine* 33, 1440–50 (2002).

Brück, W. Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neurology* 252 Suppl 5, v10–5 (2005).

Buckle, G. J. Functional magnetic resonance imaging and multiple sclerosis: the evidence for neuronal plasticity. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging* 15, 82S–93S (2005).

Budd, S. L. & Nicholls, D. G. A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca²⁺ homeostasis. *Journal of neurochemistry* 66, 403–11 (1996).

Cai, Q., Gerwin, C. & Sheng, Z.-H. H. Syntabulin-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes. *The Journal of cell biology* 170, 959–69 (2005).

Carafoli, E., Santella, L., Branca, D. & Brini, M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 36, 107–260 (2001).

Casley, C. S., Canevari, L., Land, J. M., Clark, J. B. & Sharpe, M. A. Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *Journal of neurochemistry* 80, 91–100 (2002).

Chang, A. *et al.* Neurogenesis in the chronic lesions of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 131, 2366–75 (2008).

Chang, D. T. & Reynolds, I. J. Differences in mitochondrial movement and morphology in young and mature primary cortical neurons in culture. *Neuroscience* 141, 727–36 (2006).

Chao, C. *et al.* Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *The Journal of Immunology* 149 (8), 2736–2741 (1992).

Chen, H. *et al.* Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology* 160, 189–200 (2003).

Chinta, S. J., Mallajosyula, J. K., Rane, A. & Andersen, J. K. Mitochondrial α -synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neuroscience letters* 486, 235–9 (2010).

Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B. & Scorrano, L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15927–32 (2004).

Cleeter, M. W., Cooper, J. M., Darley-Usmar, V. M., Moncada, S. & Schapira, A. H. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS letters* 345, 50–4 (1994).

Cogliati, S. *et al.* Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 155, 160–71 (2013).

Coleman, M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nature Reviews Neuroscience* 6, 889–898 (2005).

Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502–17 (2008).

Crompton, M., Moser, R., Lüdi, H. & Carafoli, E. The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *European journal of biochemistry / FEBS* 82, 25–31 (1978).

Davis, A. F. & Clayton, D. A. In situ localization of mitochondrial DNA replication in intact mammalian cells. *The Journal of cell biology* 135, 883–93 (1996).

DeLorenze, G. N. *et al.* Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Archives of neurology* 63, 839–44 (2006).

Deng, H., Dodson, M. W., Huang, H. & Guo, M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14503–8 (2008).

Detmer, S. & Chan, D. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 870–879 (2007).

Dickey, A. & Strack, S. PKA/AKAP1 and PP2A/B β 2 regulate neuronal morphogenesis via Drp1 phosphorylation and mitochondrial bioenergetics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 15716–26 (2011).

Di Penta, A. *et al.* Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. *PLoS one* 8, e54722 (2013).

Dutta, R. *et al.* Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Annals of Neurology* 59, 478–489 (2006).

Dutta, R. & Trapp, B. D. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology* 68, S22–31; discussion S43–54 (2007).

Dutta, R. & Trapp, B. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Progress in neurobiology* 93, 1–12 (2011).

Erecińska, M. & Silver, I. A. Ions and energy in mammalian brain. *Progress in neurobiology* 43, 37–71 (1994).

Ferguson, B., Matyszak, M. K., Esiri, M. M. & Perry, V. H. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology* 120 (Pt 3), 393–9 (1997).

Filippi, M. *et al.* Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 126, 433–7 (2003).

Fischer, F., Hamann, A. & Osiewacz, H. Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends in biochemical sciences* 37, 284–92 (2012).

Franklin, R. J. & Ffrench-Constant, C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nature reviews. Neuroscience* 9, 839–55 (2008).

Fransson, A., Ruusala, A. & Aspenström, P. Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 278, 6495–502 (2003).

Gähwiler, B. H., Capogna, M., Debanne, D., McKinney, R. A. & Thompson, S. M. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends in neurosciences* 20, 471–7 (1997).

Ganter, P., Prince, C. & Esiri, M. M. Spinal cord axonal loss in multiple sclerosis: a post-mortem study. *Neuropathology and applied neurobiology* 25,459–67 (1999).

Gegg, M. E. *et al.* Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human molecular genetics* 19, 4861–70 (2010).

Geurts, J. J. *et al.* Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 126, 1755–66 (2003).

Glater, E. E., Megeath, L. J., Stowers, R. S. & Schwarz, T. L. Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *The Journal of cell biology* 173,545–57 (2006).

Gnaiger, E. *et al.* Mitochondria in the cold. In: *life in the cold*. (HeldmaierG, Klingenspor M, eds) Springer, Heidelberg; Berlin; New York: pp 431-442 (2000).

Gravel, M. *et al.* Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Molecular and cellular neurosciences* 7, 453–66 (1996).

Gunter, T. E. & Sheu, S.-S. S. Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca(2+) transport mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* 1787, 1291–308 (2009).

Hackenbrock, C.R. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *Journal of Cell Biology* 30, 269-297 (1966).

Haider, L. *et al.* Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology* 134, 1914–24 (2011).

Handschin, C. & Spiegelman, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocrine reviews* 27,728–35 (2006).

Hauser, S. & Oksenberg, J. The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration. *Neuron* 52, (2006).

Hirokawa, N. & Takemura, R. Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Experimental cell research* 301, 50–9 (2004).

Hohlfeld, R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain : a journal of neurology* 120 (Pt 5), 865–916 (1997).

Hollenbeck, P. & Saxton, W. The axonal transport of mitochondria. *Journal of Cell Science* 118, 5411–5419 (2005).

Ikuta, J. *et al.* Fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) participates in the polarization of hippocampal neuron by controlling the mitochondrial motility. *Biochemical and biophysical research communications* 353,127–32 (2007).

Jin, S. M. *et al.* Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *The Journal of cell biology* 191, 933–42 (2010).

Jouaville, L. S., Ichas, F., Holmuhamedov, E. L., Camacho, P. & Lechleiter, J. D. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 377, 438–41 (1995).

Kanai, Y. *et al.* KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 6374–84 (2000).

Kang, J.-S. S. *et al.* Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation. *Cell* 132, 137–48 (2008).

Kasri, N., Govek, E.-E. & Aelst, L. Characterization of oligophrenin-1, a RhoGAP lost in patients affected with mental retardation: lentiviral injection in organotypic brain slice cultures. *Methods in enzymology* 439, 255–66 (2008).

Kim, S., Chang, R., Teunissen, C., Gebremichael, Y. & Petzold, A. Neurofilament stoichiometry simulations during neurodegeneration suggest a remarkable self-sufficient and stable in vivo protein structure. *Journal of the neurological sciences* 307, 132–8 (2011).

Kiryu-Seo, S., Ohno, N., Kidd, G., Komuro, H. & Trapp, B. Demyelination increases axonal stationary mitochondrial size and the speed of axonal mitochondrial transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 6658–66 (2010).

Koo, E. H. *et al.* Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 1561–5 (1990).

Kornek, B. *et al.* Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *The American journal of pathology* 157, 267–76 (2000).

Kornek, B. *et al.* Distribution of a calcium channel subunit in dystrophic axons in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain : a journal of neurology* 124, 1114–24 (2001).

Koshiba, T. *et al.* Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science (New York, N.Y.)* 305, 858–62 (2004).

Kraytsberg, Y. *et al.* Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nature genetics* 38, 518–20 (2006).

Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J. & Brück, W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202–2212 (2002).

Kwong, J. Q., Beal, M. F. & Manfredi, G. The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *Journal of neurochemistry* 97, 1659–75 (2006).

Langford, G. M. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 3, 859–65 (2002).

Lehnardt, S. *et al.* The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 2478–86 (2002).

Li, S., Jiang, Q. & Stys, P. K. Important role of reverse Na(+)-Ca(2+) exchange in spinal cord white matter injury at physiological temperature. *Journal of neurophysiology* 84, 1116–9 (2000).

Lin, M. T. & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–95 (2006).

Lindholm, D., Eriksson, O. & Korhonen, L. Mitochondrial proteins in neuronal degeneration. *Biochemical and biophysical research communications* 321, 753–8 (2004).

Liu, J. S., Zhao, M. L., Brosnan, C. F. & Lee, S. C. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *The American journal of pathology* 158, 2057–66 (2001).

Lovas, G., Szilágyi, N., Majtényi, K., Palkovits, M. & Komoly, S. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain : a journal of neurology* 123 (Pt 2), 308–17 (2000).

Macaskill, A. F. *et al.* Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. *Neuron* 61, 541–55 (2009).

Mahad, D., Ziabreva, I., Lassmann, H. & Turnbull, D. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology* 131, 1722–35 (2008).

Mahad, D. *et al.* Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 132, 1161–74 (2009).

Manczak, M. *et al.* Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human molecular genetics* 15, 1437–49 (2006).

Mannella, C. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763, 542548 (2006).

Marrie, R. A. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet neurology* 3, 709–18 (2004).

Martino, G. How the brain repairs itself: new therapeutic strategies in inflammatory and degenerative CNS disorders. *Lancet neurology* 3, 372–8 (2004).

Mattiazzi, M. *et al.* Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 277, 29626–33 (2002).

McCormack, J. G. & Denton, R. M. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Properties of the Ca²⁺-sensitive dehydrogenases within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat. *The Biochemical journal* 190, 95–105 (1980).

McDonald, L. J. & Moss, J. Stimulation by nitric oxide of an NAD linkage to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 6238–41 (1993).

Melov, S. *et al.* Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PloS one* 2, e536 (2007).

Miller, K. E. & Sheetz, M. P. Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *Journal of cell science* 117, 2791–804 (2004).

Mironov, S. L. Spontaneous and evoked neuronal activities regulate movements of single neuronal mitochondria. *Synapse (New York, N.Y.)* 59, 403–11 (2006).

Mironov, S. L. ADP regulates movements of mitochondria in neurons. *Biophysical journal* 92, 2944–52 (2007).

Mironov, S. L. Complexity of mitochondrial dynamics in neurons and its control by ADP produced during synaptic activity. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 2005–14 (2009).

Morais, V. A. *et al.* Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO molecular medicine* 1, 99–111 (2009).

Morris, R. L. & Hollenbeck, P. J. The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *Journal of cell science* 104 (Pt 3), 917–27 (1993).

Müftüoğlu, M. *et al.* Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 19, 544–8 (2004).

Muriel, P., Castañeda, G., Ortega, M. & Noël, F. Insights into the mechanism of erythrocyte Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by nitric oxide and peroxynitrite anion. *Journal of applied toxicology : JAT* 23, 275–8 (2003).

Mutsaers, S. E. & Carroll, W. M. Focal accumulation of intra-axonal mitochondria in demyelination of the cat optic nerve. *Acta neuropathologica* 96, 139–43 (1998).

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F. F. & Youle, R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology* 183, 795–803 (2008).

Nave, K.-A. & Trapp, B. Axon-glial signaling and the glial support of axon function. *Annual review of neuroscience* 31, 535–61 (2008).

Nave, K.-A. A. Myelination and the trophic support of long axons. *Nature reviews. Neuroscience* 11, 275–83 (2010).

Nikić, I. *et al.* A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature medicine* 17, 495–9 (2011).

Olichon, A. *et al.* The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS letters* 523, 171–6 (2002).

Otera, H. *et al.* Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 191, 1141–58 (2010).

Pantano, P., Mainero, C. & Caramia, F. Functional brain reorganization in multiple sclerosis: evidence from fMRI studies. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging* 16, 104–14 (2006).

Pasinelli, P. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 43, 19–30 (2004).

Picard, M., White, K. & Turnbull, D. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 114, 161–71 (2013).

Pilling, A. D., Horiuchi, D., Lively, C. M. & Saxton, W. M. Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Molecular biology of the cell* 17, 2057–68 (2006).

Pyle, A *et al.* Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD. *Annals of neurology* 57, 564–7 (2005).

Qi, X., Lewin, A. S., Sun, L., Hauswirth, W. W. & Guy, J. Mitochondrial protein nitration primes neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of biological chemistry* 281, 31950–62 (2006).

Reddy, H. *et al.* Evidence for adaptive functional changes in the cerebral cortex with axonal injury from multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 123 (Pt 11), 2314–20 (2000).

Reddy, P. H., Mao, P. & Manczak, M. Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease. *Brain research reviews* 61, 33–48 (2009).

Renganathan, M., Cummins, T. R. & Waxman, S. G. Nitric oxide blocks fast, slow, and persistent Na⁺ channels in C-type DRG neurons by S-nitrosylation. *Journal of neurophysiology* 87, 761–75 (2002).

Rintoul, G. L., Bennett, V. J., Papaconstantinou, N. A. & Reynolds, I. J. Nitric oxide inhibits mitochondrial movement in forebrain neurons associated with disruption of mitochondrial membrane potential. *Journal of neurochemistry* 97, 800–6 (2006).

Rocca, M. A. *et al.* Cortical adaptation in patients with MS: a cross-sectional functional MRI study of disease phenotypes. *Lancet neurology* 4, 618–26 (2005).

Rosen, D. R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62 (1993).

Rowland, K. C., Irby, N. K. & Spirou, G. A. Specialized synapse-associated structures within the calyx of Held. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 9135–44 (2000).

Russo, G. J. *et al.* Drosophila Miro is required for both anterograde and retrograde axonal mitochondrial transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 5443–55 (2009).

Ruthel, G. & Hollenbeck, P. J. Response of mitochondrial traffic to axon determination and differential branch growth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 8618–24 (2003).

Sánchez, I., Hassinger, L., Paskevich, P. A., Shine, H. D. & Nixon, R. A. Oligodendroglia regulate the regional expansion of axon caliber and local accumulation of neurofilaments during development independently of myelin formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 5095–105 (1996).

Saris, N.-E. L. E. & Carafoli, E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry. Biokhimiia* 70, 187–94 (2005).

Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y. & Endo, H. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications* 300, 482–93 (2003).

Scarffe, L., Stevens, D., Dawson, V. & Dawson, T. Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends in Neurosciences* 37, 315324 (2014).

Scarpulla, R. C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological reviews* 88, 611–38 (2008).

Schapira, A. H. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet neurology* 7, 97–109 (2008).

Scorrano, L. *et al.* A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Developmental cell* 2, 55–67 (2002).

Sheng, Z.-H. & Cai, Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nature reviews. Neuroscience* 13, 77–93 (2012).

Silver, I. & Erecińska, M. Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. *Advances in experimental medicine and biology* 454, 7–16 (1998).

Smith, K. J. & Lassmann, H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet neurology* 1, 232–41 (2002).

Smith, K. J. Sodium channels and multiple sclerosis: roles in symptom production, damage and therapy. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 17, 230–42 (2007).

Song, D. D., Shults, C. W., Sisk, A., Rockenstein, E. & Masliah, E. Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP. *Experimental neurology* 186, 158–72 (2004).

Stadelmann, C. *et al.* BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain : a journal of neurology* 125, 75–85 (2002).

Stadelmann, C., Albert, M., Wegner, C. & Brück, W. Cortical pathology in multiple sclerosis. *Current opinion in neurology* 21, 229–34 (2008).

Stagi, M., Gorlovoy, P., Larionov, S., Takahashi, K. & Neumann, H. Unloading kinesin transported cargoes from the tubulin track via the inflammatory c-Jun N-terminal kinase pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20, 2573–5 (2006).

Stys, P. K., Waxman, S. G. & Ransom, B. R. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12, 430–9 (1992).

Tanaka, A. *et al.* Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *The Journal of cell biology* 191, 1367–80 (2010).

Takeuchi, H., Kobayashi, Y., Ishigaki, S., Doyu, M. & Sobue, G. Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of biological chemistry* 277, 50966–72 (2002).

Trapp, B. *et al.* Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine* (1998). doi:10.1056/NEJM199801293380502

Trapp, B. D., Ransohoff, R. & Rudick, R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Current opinion in neurology* 12, 295–302 (1999).

Trapp, B. & Nave, K.-A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder. *Annual review of neuroscience* 31,247–69 (2008).

Trapp, B. D. & Stys, P. K. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurology* 8, 280-291 (2009).

Van der Valk, P. & De Groot, C. J. Staging of multiple sclerosis (MS) lesions: pathology of the time frame of MS. *Neuropathology and applied neurobiology* 26, 2–10 (2000).

Van Horssen, J. *et al.* Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free radical biology & medicine* 45, 1729–37 (2008).

Vijayvergiya, C., Beal, M. F., Buck, J. & Manfredi, G. Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 2463–70 (2005).

Villoslada, P. & Genain, C. P. Role of nerve growth factor and other trophic factors in brain inflammation. *Progress in brain research* 146, 403–14 (2004).

Vives-Bauza, C. *et al.* PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 378–83 (2010).

Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W. & Reichert, A. S. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *The Journal of cell biology* 175,237–47 (2006).

Wang, X. & Schwarz, T. L. The mechanism of Ca²⁺ -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell* 136, 163–74 (2009).

Wang, X. *et al.* The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 109 Suppl 1, 153–9 (2009).

Waxman, S. G. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nature reviews. Neuroscience* 7, 932–41 (2006).

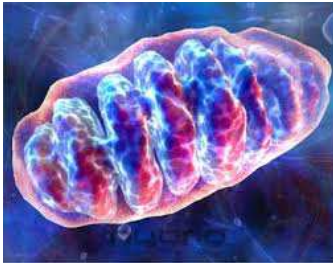
Werth, J. L. & Thayer, S. A. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14, 348–56 (1994).

Witte, M. E. *et al.* Reduced expression of PGC-1 α partly underlies mitochondrial changes and correlates with neuronal loss in multiple sclerosis cortex. *Acta neuropathologica* 125, 231–43 (2013).

Youle, R. J. & Karbowski, M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 657–63 (2005).

Zambonin, J. *et al.* Increased mitochondrial content in remyelinated axons: implications for multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* 134,1901–13 (2011).

Zhang, C. L., Ho, P. L., Kintner, D. B., Sun, D. & Chiu, S. Y. Activity-dependent regulation of mitochondrial motility by calcium and Na/K-ATPase at nodes of Ranvier of myelinated nerves. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 3555–66 (2010).



X. ABREVIATURAS Y FÓRMULAS

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

AMP: Adenosín monofosfato

APP: proteína precursora amiloide

AR: Aspect ratio

ATP: Adenosín trifosfato

BME: Medio basal con sales de Earle

BSA: Seroalbúmina bovina

β A: Proteína β -ameliode

CM-H₂DCFDA: 5-(-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato, acetil éster

CNPasa: 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa

COX IV: Citocromo C oxidasa Subunidad IV

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DIV: Días *in vitro*

DMEM: Medio modificado de Dulbecco y Eagle

Drp1: Proteína dinamina-1-like (GTPasa mitocondrial)

EA: Enfermedad de Alzheimer

EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental

EGTA: Ácido etilenglicol tetraacético

EH: Enfermedad de Huntington

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

EM: Esclerosis múltiple

EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva

EMRR: Esclerosis múltiple remitente recurrente

EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva

EP: Enfermedad de Parkinson

ETS: Sistema de transporte electrónico

FADH₂: flavín adenín dinucleótido, forma reducida

FBS: Suero bovino fetal

FCCP: Carbonil cianida-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona

FIS1: Proteína mitocondrial de la fisión 1

HBSS: Solución amortiguadora de sales de Hank

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico

HS: Suero de caballo

HTT: Huntingtina

Iba1: Ionized calcium binding adapter molecule 1

IFN- γ : Interferón gamma

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-6: Interleuquina 6

iNOS: Sintasa de óxido nítrico inducible

JNK: c-Jun N-terminal kinasa

KIF5: Kinesina 1

LB, medio: Lysogeny broth

LPS: Lipopolisacárido

MBP: Proteína básica de la mielina

MEM: Medio mínimo esencial

MFF: Factor de la fisión mitocondrial

Mfn1: Mitofusina 1

Mfn2: Mitofusina 2

MIR05: Buffer de respiración mitocondrial

Miro: GTPasa Rho mitocondrial

MOG: Glicoproteína mielínica de oligodendrocitos

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

MTT: Bromuro 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

Na⁺/K⁺ ATPasa: bomba sodio-potasio ATPasa

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NEAA: Aminoácidos no esenciales

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NF-H: Subunidad pesada de neurofilamento

NF-L: Subunidad ligera de neurofilamento

OPA1: Optic atrophy 1 (proteína dinamina-like mitocondrial)

OXPPOS: Oxidative phosphorylation (fosforilación oxidativa)

Parkin: Proteína del Parkinson 2 (E3 ubiquitin ligasa)

PARL: Presenilins-associated rhomboid-like protein (serin proteasa mitocondrial)

PB: Buffer fosfato

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

Pi: fosfato inorgánico

PINK1: Kinasa 1 inducida por PTEN (serin-treonin proteín kinasa mitocondrial)

PTP: Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial

PVDF: Poliviniliden difluoruro

RNS: especies reactivas de nitrógeno

ROS: especies reactivas de oxígeno

ROX: Residual oxygen consumption (consume de oxígeno residual)

SMI-32: Subunidad pesada de neurofilamentos no fosforilada

SNC: Sistema nervioso central

SOD1: Superóxido dismutasa tipo 1

SUIT: substrate-uncoupler-inhibitor titration

SUO: Succinate ubiquinona oxidorreductasa

TE buffer: Tris-EDTA buffer

TEM: microscopía electronica de transmisión

TLR4: Toll-like receptor 4

TMPD: N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TRAK: Trafficking Kinesin Protein

WB: Western blot

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

Fórmulas

Ca^{2+} : Ión calcio

CuSO_4 : Sulfato de cobre

H_2O : Agua

H_2O_2 : Peróxido de hidrógeno

HCl : Ácido clorhídrico

K^+ : Ión potasio

KH_2PO_4 : Fosfato de potasio monobásico

MgCl_2 : Cloruro de magnesio

Na^+ : Ión sodio

NO : Óxido nítrico

O_2 : Oxígeno



XI. ANEXOS

Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokines Contribute to Demyelination and Axonal Damage in a Cerebellar Culture Model of Neuroinflammation

Alessandra di Penta^{1,2}, Beatriz Moreno¹, Stephanie Reix³, Begoña Fernandez-Diez¹, Maite Villanueva¹, Oihana Errea¹, Nagore Escala¹, Koen Vandenberg^{2,4}, Joan X. Comella³, Pablo Villoslada^{1*}

1 Center of Neuroimmunology, Institute of Biomedical Research August Pi Sunyer (DIBAPS) – Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona Spain, **2** Neurogenomik, University of the Basque Country (UPV/EHU), Leioa, Spain, **3** Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona and CIBERNED, Barcelona, Spain, **4** IKIRBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

Abstract

Background: Demyelination and axonal damage are critical processes in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS). Oxidative stress and pro-inflammatory cytokines elicited by inflammation mediate tissue damage.

Methods/Principal Findings: To monitor the demyelination and axonal injury associated with microglia activation we employed a model using cerebellar organotypic cultures stimulated with lipopolysaccharide (LPS). Microglia activated by LPS released pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF α), and increased the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and production of reactive oxygen species (ROS). This activation was associated with demyelination and axonal damage in cerebellar cultures. Axonal damage, as revealed by the presence of non-phosphorylated neurofilaments, mitochondrial accumulation in axonal spheroids, and axonal transection, was associated with stronger iNOS expression and concomitant increases in ROS. Moreover, we analyzed the contribution of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress in demyelination and axonal degeneration using the iNOS inhibitor ethyl pyruvate, a free-scavenger and xanthine oxidase inhibitor allopurinol, as well as via blockage of pro-inflammatory cytokines using a Fc-TNFR1 construct. We found that blocking microglia activation with ethyl pyruvate or allopurinol significantly decreased axonal damage, and to a lesser extent, demyelination. Blocking TNF α significantly decreased demyelination but did not prevent axonal damage. Moreover, the most common therapy for MS, interferon-beta, was used as an example of an immunomodulator compound that can be tested in this model. *In vitro*, interferon-beta treatment decreased oxidative stress (iNOS and ROS levels) and the release of pro-inflammatory cytokines after LPS stimulation, reducing axonal damage.

Conclusion: The model of neuroinflammation using cerebellar culture stimulated with endotoxin mimicked myelin and axonal damage mediated by the combination of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines. This model may both facilitate understanding of the events involved in neuroinflammation and aid in the development of neuroprotective therapies for the treatment of MS and other neurodegenerative diseases.

Citation: di Penta A, Moreno B, Reix S, Fernandez-Diez B, Villanueva M, et al. (2013) Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokines Contribute to Demyelination and Axonal Damage in a Cerebellar Culture Model of Neuroinflammation. PLOS ONE 8(2): e54722. doi:10.1371/journal.pone.0054722

Editor: Martin Stangel, Hannover Medical School, Germany

Received: August 3, 2012; **Accepted:** December 14, 2012; **Published:** February 19, 2013

Copyright: © 2013 di Penta et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III: FIS P1041445 (MIOTRED) to PV; RETICS program: Red Española de Esclerosis Múltiple to PV (RD07/0060/091) and KV (RD07/0060/2005); SAIO TEK 2009 program of the Gobierno Vasco, ref. S-PE09UN33 ("ERtek") to KV and the Juan de la Cierva program of the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) to AdP. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: PV serves as Academic Editor in PLOS ONE. PV is founder and hold stocks in Bionum: Farma SL. PV has received consultancy fees from Novartis, Roche, Medimmune, Heidelberg Engineering, Digna Biotech, Neurotec, and Bionure Farma. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: pvilloslada@clinicub.es

Introduction

Axonal damage is a critical process in the pathogenesis of several chronic brain diseases, including neurodegenerative diseases, (Alzheimer's disease, Parkinson's diseases, and amyotrophic lateral sclerosis) inflammatory diseases (multiple sclerosis), or acute diseases such as stroke and brain trauma [1,2,3]. Axonal damage is a complex process that involves alterations in multiple pathways, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, ischemia, ATP depletion, ion channel redistribution, axonal transport impairment and reduction in trophic support [4]. These processes

converge to induce Wallerian degeneration and dying-back, or axonal degeneration. By identifying the pathways that contribute to axonal damage, new avenues toward the development of neuroprotective therapies to treat brain diseases could be opened [2].

Oxidative stress is a deleterious condition that can cause cell damage, and subsequent cell death, due to oxidation of cardinal cellular components, such as lipids, proteins, and DNA [5]. Reactive oxygen species (ROS) are generated via several reactions, including the incomplete reduction of bimolecular oxygen (O₂),

resulting in the generation of superoxide ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radicals ($\bullet OH$) and hydroxyperoxide (H_2O_2). The most common cellular free radicals are the hydroxyl radical ($\bullet OH$), the superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), and nitric oxide ($NO\bullet$). Other molecules that are not free radicals but that can lead to the generation of free radicals through various chemical reactions include hydrogen peroxide (H_2O_2) and peroxynitrite ($ONOO^-$). These ROS can be counterbalanced by natural enzymatic antioxidants (e.g., superoxide dismutase, catalase) and non-enzymatic antioxidants (e.g., uric acid, ascorbic acid, glutathione), which are expressed under the control of transcription factors, such as nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). The central nervous system (CNS) appears to be especially vulnerable to oxidative stress due to its high rate of oxygen consumption, the abundance of iron, the low levels of molecular antioxidants, and the susceptibility of neurons or oligodendrocytes due to their particular metabolic properties [6].

The study of the contribution of different pathways to CNS damage and the effects of therapies in preventing such damage requires the development of suitable models. Here we characterize at the morphological level an *in vitro* model of brain inflammation by challenging cerebellar cultures with endotoxin in order to promote microglia activation. In this model, we assessed the role of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in producing axonal damage and demyelination as a response to microglial activation. Studies were performed in mouse cerebellar organotypic cell cultures, which provide a well-preserved structure of brain tissue including all implicated cell populations (microglia, astrocytes, neurons, axons, myelin and oligodendrocytes). We found that in response to inflammation due to microglia activation in cerebellar organotypic cultures the axons and myelin were damaged by the induction of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines.

Materials and Methods

Animals and cerebellar organotypic cultures

All animal experiments were performed using C57BL/6J mice (Harlan Laboratories). Animals were handled in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC amended by Directive 2005/65/EC) and the Spanish regulations for the procurement and care of experimental animals (1201 RD/

2005, October 10), and the study was approved by the Ethical Committee on Animal Research of the University of Barcelona. All possible efforts were made to minimize animal suffering and limit the number of animals used. Cerebellar slice cultures were based on previously published protocols [7,8] and were prepared from 8-day-old C57BL/6 mice. Cerebellum was cut using a vibratome obtaining tissue slices (350 μm thick). Three slices were plated on Millicell-CM culture inserts. Cultures were incubated at 37°C, 5% CO_2 in 50% basal medium containing Earle's salt, 25% Hark's buffered salt solution, 25% inactivated horse serum, 5 mg/ml glucose, 0.25 mM L-glutamine and 25 $\mu g/ml$ Penicillin/Streptomycin. In all experiments, cerebellar slices were maintained in culture for 7 days for reducing microglia activation and allowing cultures to myelinate before commencing the studies. After 7 days *in vitro* (DIV), cultures were treated with different concentrations of LPS (5, 10, 15 and 20 $\mu g/ml$) for 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h, and then fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for immunofluorescence analysis, or homogenized to obtain protein extracts. Untreated control tissue (both for microscopy imaging and for molecular analysis) was incubated for identical periods of time as treated cultures.

BV-2 culture

BV-2 cells were generously provided by Prof Antonio Celada (IRB, Barcelona, Spain) [9] and were maintained in DMEM containing 5% heat inactivated FBS, 4mM L-Glutamine (SAPC biosciences), 20 mM Hepes (Sigma) and appropriate antibiotics at 37°C in a humidified chamber with 5% CO_2 . Before treatment cells were washed twice with DMEM, then incubated 6, 12 or 24 h in 10 ml of serum-free medium containing 100 ng/ml LPS (Sigma LA391) and different concentrations of Allopurinol (100 μM or 1 mM).

Immunofluorescence microscopy

Cerebellar slices were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 40 min, washed with PBS for 10 min, and blocked at RT for 2 h in 10% normal goat serum (NGS: Vector Laboratories, Burlingame, USA) and 0.5% Triton X-100 in PBS. The slices were incubated overnight at 4°C with the distinct primary antibodies (Table 1) in blocking solution (10% NGS and 0.3%

Table 1. List of primary antibodies used for immunofluorescence studies.

Antigen	Description	Dilution	Company
MHCII	Major Histocompatibility Complex class II: rat anti-mouse MHC class II (I-A) monoclonal antibody	1:300	Chemicon
CD11b/OX42	mouse anti-rat CD11b	1:150	Serotec
NFL	Neurofilament light C28E10, rabbit mAb	1:500	Cell Signaling
NFH	Neurofilament heavy (phosphorylated and non-phosphorylated NFH): rabbit polyclonal antiserum against the 200 kD Neurofilament Heavy, Ref. Ab81351	1:200	AbCam
SMI32	non-phosphorylated neurofilament heavy SMI32	1:200	Sterberg
MBP	Myelin Basic Protein: rat anti-MBP (82-67) antibody	1:200	Serotec
NeuN	Neuronal Nuclei: anti-NeuN mouse mAb	1:500	Chemicon
INO5	Inducible nitric oxide synthase: purified rabbit anti-iNOS/NOS type II	1:200	BD Bioscience
COXI	Mitochondrial Complex IV subunit I monoclonal antibody (COXI)	1:200	MitoScience
Casp3	Caspase 3: anti-Casp3 rabbit	1:300	Cell Signaling
Iba1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1: anti-Iba1, rabbit	1:400	Wako
Nrf2	Nrf2 (K-20)	1:75	Santa Cruz

doi:10.1371/journal.pone.0054722.t001

Triton X-100 in PBS). After further washing, the slices were incubated in blocking solution containing the secondary antibody mixture prior to three washes with PBS. The secondary antibodies used were mouse IgG Cy2-linked, rabbit IgG Cy3-linked (from goat, 1:200, GE Healthcare, Freiburg, Germany) and goat anti-rat IgG Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes, Eugene, OR). Propidium iodide (Fluka) was used at 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 2 h at 37°C and 5% CO_2 . The slices were mounted in Gel/Mount anti-fading mounting medium (Biomed, Foster City, CA) and pictures were made by confocal scanning microscopy from single images all through the whole tissue (but avoiding the surface of the culture in contact with air) (Zeiss LSM 510). Demyelination and axonal loss were quantified as described elsewhere [10,11]. Briefly, demyelination was quantified as the percentage of axons stained with NIL with MBP surrounding sheaths respect to the total number of axons (without MBP sheaths). Axonal loss was quantified as the percentage of axons stained with non-phosphorylated neurofilaments (SMI32) respect to the total number of axons (NH: phosphorylated and non-phosphorylated neurofilaments).

Electron microscopy

The cerebellar slices were fixed for 24 h in 2% PFA and 2.5% glutaraldehyde in PBS 0.1 M at 4°C. Then, they were washed in PBS 0.1 M for 12 h before post-fixation treatment with 2% osmium tetroxide in PBS 0.1 M for 1 h at 4°C, followed by posterior dehydration and inclusion in Epoxy embedding medium (EPON). Ultra-thin sections were stained with 1% uranylacetate and lead citrate solution. Samples were observed with a Tecnai SPIRIT Transmission Electron Microscope (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands) working at an acceleration voltage of 120 KV. Images were acquired with a Megaview III camera and digitized with the program iTEM (Soft Imaging System).

TUNEL assay

Tissues sections, fixed with 4% PFA, were permeabilized with 1.5% Triton X-100 (in PBS) overnight at 4°C. Then the solution was removed to add sodium citrate solution (0.1% in H_2O) 1 h at RT. The detection of cells with DNA-strand breaks was performed by the TUNEL labelling method using terminal transferase recombinant and the Fluorescein-12-dUTP (ROCHE) for 2h at 37°C. The reaction was stopped with 20 mM EGTA and the sections were washed 2 times with PBS. The labeled slides were analyzed by confocal microscopy (Olympus FV1000). In addition, for cell death quantification, nuclei were stained with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Hoechst 33342. Hoechst stained nuclei were scored as number of total cells and TUNEL positives cells were scored as dead.

Active caspase-3 immunofluorescence

Cultures were rinsed with PBS at RT and fixed in 4% PFA for 30 min. They were then washed twice with PBS and permeabilized and blocked with 3% FBS and 0.1% Triton X-100 in PBS for 60 min. Cultures were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3 (Cell Signaling) diluted 1:150, rinsed three times with PBS, and incubated with Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (Molecular Probes, Eugene, OR) diluted 1:250 for 1 h at RT and protected from light. Finally, cells were stained with 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33258 for 30 min. For double staining Casp3/MBP the cultures were permeabilized as describe above and incubated overnight at 4°C with polyclonal anti-cleaved caspase-3 and rat anti-MBP (1:200). Alexa Fluor 546-conjugated anti-rabbit and 488-conjugated anti-rat secondary antibodies were used.

ELISA

Mouse cerebellar organotypic cultures were stimulated with LPS for different periods of time (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hrs), or with LPS plus IFN- β (1000U/ μl ; Calbiochem) or Allopurinol (100 μM or 1 mM) and the culture supernatants were collected to quantify the secreted IL-1 β , TNF- α and IL-6. Mouse ELISA Kits were used according to the manufacturer's instructions (eBioscience, San Diego, CA, USA).

Western Blots

Three cerebellar slices per group were used for analysis. Western-blots were performed as previously described [12]. Briefly, total protein (10 μg) from cerebellar slices was separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a nitrocellulose membrane and hybridized for 2 h or overnight with primary antibodies diluted in the same blocking buffer: mouse anti-CINPase (2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase) 1:500 (Abcam), rabbit anti-iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) 1:200 (BD Bioscience). Protein load was assessed and normalized using Ponceau S staining. Antibody binding was detected with HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (Cell Signaling) used at a concentration of 1:2,000.

ROS Assays

ROS were assayed with H_2DCFDA (50 μM , Invitrogen) added to the cerebellar organotypic cultures for 1 hour at 37°C. Unincorporated H_2DCFDA was removed by washing the slices twice with PBS and the fluorescence was measured on a spectrofluorometer after excitation at 485 nm and emission at 535 nm.

Blocking TNF- α using the recombinant Fc-TNFR1 construct

Fc-TNFR1 was produced as described previously [13]. After 7 days in culture the Fc-TNFR1 construct (Fc-TNFR1: 1/50 dilution) was added 2 h before challenging the cultures with human TNF- α at 20 and 40 ng/ml. Samples were collected 24 and 48 h after LPS stimulation, fixed in 4% PFA for 45 minutes and stored at 4°C in PBS-azide until immunostaining was performed.

MTT assay

The MTT assay was performed 24 and 48 h after the TNF α challenge to assess cell survival in the organotypic tissue after exposure to Fc-TNFR1 and prior to the TNF- α challenge. The results provided us with the optimal concentration of Fc-TNFR1 required to block endogenous TNF- α . MTT (50 μl , final concentration 0.5 mg/ml) was added to each well and the tissue was incubated for 3 h at 37°C. The tissue was recovered in 0.1 M HCl 2-propanol, incubated again for 25 minutes at room temperature and centrifuged at maximum speed for 3 min. The supernatants were analyzed by spectrophotometer at 570 nm.

Quantitative PCR (qPCR)

Three cerebellar slices per group were used for analysis. RNA was extracted following the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel) and quantified with Nanodrop. RNA (100 ng) was reverse-transcribed to cDNA using random primers according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Subsequently, qPCR was performed with the Supermix for *SsoFast* EvaGreen (Biorad) on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) and the qPCR QuantiTect Primer Assay were performed for each of the target genes (Qiagen). The expression

of the transcripts of interest was normalized to that of endogenous HPRT1, and the data expressed relative to the mean expression in the untreated control group.

Statistical analysis

All experiments were performed at least three times, and control cultures were time-matched with testing cultures. The values were expressed as the means \pm SEM. The Student's *t*-tests (in Fig. 1, 2, 3 and Supp. Fig. S1 and S3) or ANOVA (in Fig. 4, 5, 6 and 7) were used to determine statistical significance and all analyses were performed using SPSS 15.0 software (IBM).

Results

LPS induces microglia activation in mice cerebellar organotypic cultures

In order to reproduce microglia activation as one of the mechanisms present in neuroinflammation, cerebellar organotypic cultures were challenged with LPS. First, we determined the

concentration and timing of LPS needed to induce microglia activation by treating the cultures for 24 h with different concentration of LPS (5, 10, 15 and 20 μ g/ml), and analyzing the kinetics of IL-1 β , TNF- α and IL-6 release over 96 h by ELISA (Supp. Fig. S1). When cultures were challenged with doses up to 15 μ g/ml, LPS induced a dose-dependent production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β (Supp. Fig. S1A). Peak levels of secreted TNF- α , IL-6 and IL-1 β were observed 3, 12 and 24 h after LPS challenge, respectively. While the release of IL-1 β was transient, constant high levels of TNF- α and IL-6 were secreted from 3 h up to the last measurement at 96 h (approximately 500 pg/ml and 1800 pg/ml, respectively) (Supp. Fig. S1B). To assess microglia activation, organotypic cultures were stained with markers of activated microglia such as MHCII and OX42 [14]. We observed the presence of amoeboid shaped microglial cells, with enhanced MHC-II and OX42 expression 24 h after LPS challenge (Supp. Fig. S1C), both features indicative of microglial activation. We did not observe MHC-II and OX42

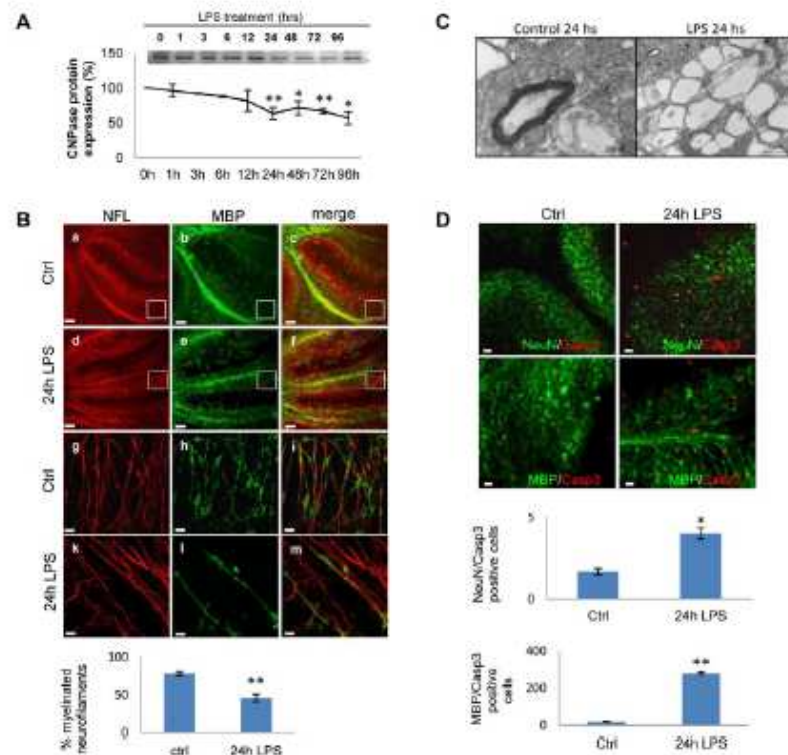


Figure 1. Microglial activation induces demyelination in mouse cerebellar cultures. A) Cerebellar cultures were stimulated with LPS (15 μ g/ml) for different periods of time (0 to 96 h) and CNPase expression was assessed by Western-blot. Protein expression was quantified and normalized to the total protein loaded, and the results are expressed as a percentage with respect to the controls (100%). Error bars indicate the standard error. $**P < 0.01$. B) Immunofluorescence for NfH (red) and MBP (green) in cerebellar cultures treated with LPS (15 μ g/ml; panels d-f and k-m) or control slices (Ctrl; panels a-c and g-i). Panels g-m show a higher magnification ($\times 60$) of images in a-f (white boxes in panels a-f). Scale bars = 100 μ m (panels a-f) and 5 μ m (panels g-m). The graph represent the percentage of myelinated axons (double staining for MBP and NfH) compared to unmyelinated axons (NfH). C) Cultures were treated with LPS for 24 h and then demyelination was analyzed by electron microscopy. D) Cerebellar cultures were treated with LPS (15 μ g/ml) for 24 h and then immunostained for MBP/Casp3 or NeuN/Casp3 colabeling. Scale bar = 10 μ m. The graphs represent the percentage of cell death by quantifying the co-localization of active Casp3 immunofluorescence in conjunction with MBP or NeuN staining. Student's *t*-test was used to determine statistical significance. doi:10.1371/journal.pone.0054722.g001

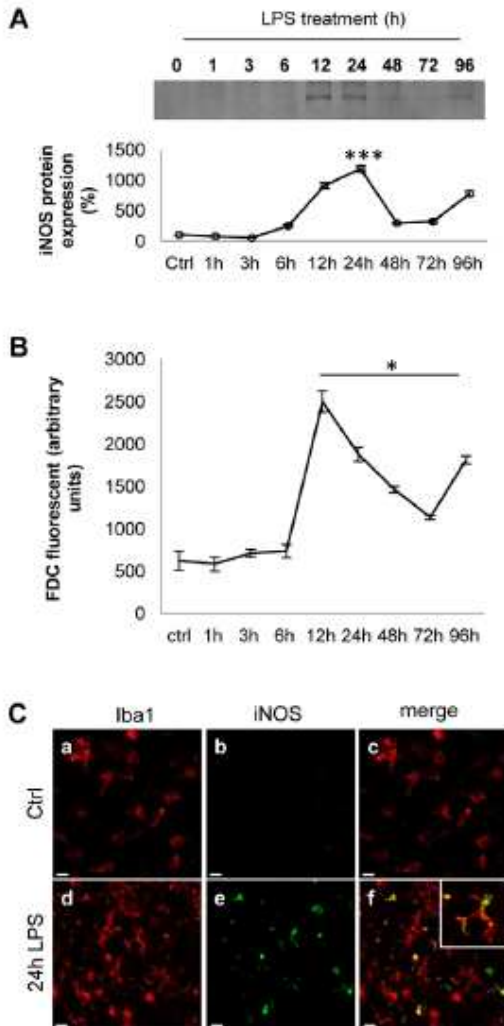


Figure 2. Microglial activation by LPS induces oxidative stress in cerebellar cultures. A) iNOS expression after LPS challenge: Western-blot analysis of iNOS expression in cerebellar cultures after LPS stimulation (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Band intensity was calculated by densitometry and expressed as a percentage in the graph. The change in iNOS expression was calculated with respect to control (untreated cultures) and normalized with respect to total protein. Error bars indicate the standard error. *** $P < 0.001$. B) ROS production after LPS challenge: cerebellar cultures were treated with LPS for different periods of time and ROS generation was measured by spectrofluorometry. Values in the bar graph represent arbitrary units and the error bars indicate the standard error. * $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. C) Expression of iNOS by activated microglia: Cerebellar cultures were treated with LPS for 24 h and immunostained for Iba1 (red, panels a and d) and iNOS (green, panels b and e) in organotypic cultures treated with LPS (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. Panels c and f shows the merged signals. Inset shows an enlarged image from panel f. Scale bar = 10 μm . doi:10.1371/journal.pone.0054722.g002

positive cells in the control cultures at the same time point (data not shown).

Activation of microglia by LPS induces demyelination and oligodendrocyte death

To determine whether neuroinflammation induces demyelination in the cerebellar organotypic model, we analyzed CNPase protein expression in Western-blot. Cultures were grown for 7 DIV to allow significant myelination and then exposed to LPS (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h, which produced a 40% loss of CNPase protein after 96 h, which had fallen significantly by 24 h (Fig. 1A). Slices were also counterstained with NL and MBP antibodies (Fig. 1B) for different times after LPS treatment. We observed significant demyelination at 24 h, revealed as a decrease in the intensity of myelin immunoreactivity at different magnifications that was maintained until 96 h (Fig. 1B and Supp. Fig. S2). The 24 h time point was therefore used as reference in all subsequent demyelination experiments. Confocal analysis revealed only a few myelinated axons (Fig. 1B, panel m) in LPS-challenged cultures when compared to time-matched controls. In cultures treated with LPS, the myelin staining appeared punctuate and sharp, a hallmark of myelin damage. CNPase staining revealed a similar profile of demyelination as MBP staining (data not shown). In response to LPS treatment there was an approximately 2-fold decrease in MBP staining compared to time-matched control tissue (Fig. 1B, graph). Demyelination after LPS challenge was confirmed by electron microscopy (Fig. 1C).

To determine whether LPS stimulation induced the cell death, cultures were exposed to LPS (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h, and stained for activated (cleaved) caspase 3 (Fig. 1D and Supp. Fig. S3B). LPS treatment enhanced glia cell death that was mainly involving oligodendrocytes, revealed by an increased number of MBP/Casp3-positive cells (Fig. 1D). Evidence of oligodendrocytes cell death was also obtained when the cultures were labeled with propidium iodide (PI) for the last 2 h, revealing an increased number of MBP/PI-positive cells (Supp Fig. S3A), although some other glial cell types cannot be excluded. In contrast, only a few neurons died in the grey matter, as revealed by NeuN/Casp3, NeuN/PI and Hoechst/Casp3 co-labeling (Fig. 1D and Supp. Fig. S3A and B). These findings indicate that exposure to LPS induced significant cell death in the white matter, and is consistent with oligodendrocyte cell death seen in the LPS model of optic nerve injury [15].

LPS induces oxidative stress and axonal damage in mouse cerebellar cultures

To analyze whether LPS induce oxidative stress in mice organotypic cultures, we quantified iNOS expression and ROS production at different times after LPS challenge (0 to 96 h, Fig. 2). Western blot analysis showed that LPS increased levels of iNOS protein peaking at 12 to 24 h after challenge and decreased subsequently up to the study end-point (96 h, Fig. 2A). Furthermore, using fluorescent assay with H_2DCFDA we observed a 100% and 40% increase in ROS production 12 h and 24 h after the LPS challenge, respectively (Fig. 2B). To verify whether the actual producer cells of iNOS were microglia or astrocytes, the cultures were immunostained for iNOS and the microglial marker Iba1 after LPS stimulation. As expected, in the slices treated with LPS, iNOS was mainly expressed by microglia cells (Fig. 2C).

Presence of axonal damage was assessed by double immunostaining for both total (phosphorylated and non-phosphorylated) NfH and non-phosphorylated NfH (SMI32; Fig. 3A). In response to LPS treatment, non-phosphorylated NfH was found to

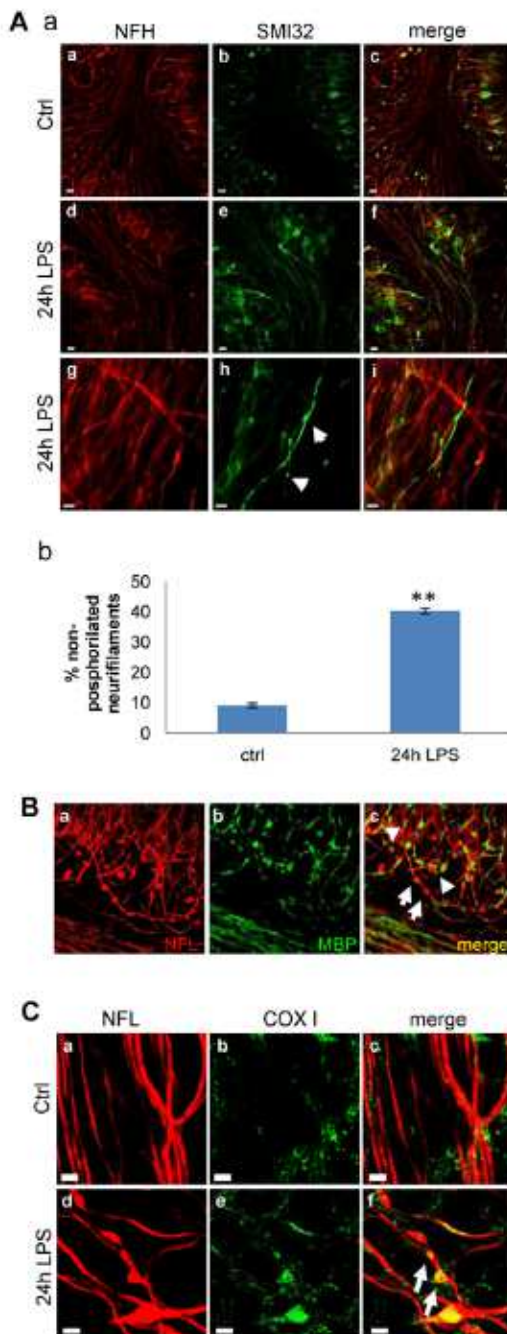


Figure 3. Microglial activation induces axonal damage in mouse cerebellar cultures. A) Immunostaining (a) for total neurofilament-heavy (NFH; red) and dephosphorylated NFH (SMI32; green). Panels a-c show control slices (Ctrl) while LPS treated slices are shown in panels d-f. Panels g-i show higher magnification images of d-f. Scale bar = 20 μ m (panels a-f) and 10 μ m (panels g-i). Graph (b):

percentage of non-phosphorylated neurofilament with respect to total neurofilaments in cerebellar cultures stimulated for 24 h with LPS. Error bars indicate the standard error. ** $P < 0.01$. Student's *t*-test was used to determine statistical significance. B) Immunostaining for NFL (red) and MBP (green) in the same conditions as in A. Arrows indicate axonal beads and arrowheads indicate axonal transection (end-bulbs). Scale bar = 5 μ m. C) Immunostaining for NFL (red) and Complex IV subunit-I (COX I, green): Neurofilament staining revealed the presence of axonal beads. Arrows indicate mitochondrial accumulation in neurofilaments. Scale bar = 5 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0054722.g003

accumulate in the neurofilaments (arrows in Fig. 3A panel h) with a 4-fold increase at 24 h compared to total NFH, suggesting presence of axonal dysfunction (Fig. 3A, panel b). Furthermore, axonal dysfunction was visible in slices challenged with LPS by means of immunostaining for NFL and MBP, showing the formation of swollen structures (beading or spheroids; arrows in Fig. 3B, panel c and Supp. Fig. S2) indicating impaired axonal transport, as well as with axonal transection (end-bulbs; arrowheads in Fig. 3A, panel c and Supp. Fig. S2) [1]. Based on our results showing maximum axonal damage by 24 h after LPS challenge, this time point was used for assessing axonal damage. Finally, we analyzed the changes in the distribution of axonal mitochondria by staining the respiratory chain complex IV subunit-I (COX-I) after stimulation with LPS (15 μ g/ml) for 24 h (Fig. 3 C). We observed an accumulation of COX-I labeled mitochondria in the spherical axon bulbs, indicative of altered mitochondrial transport (Fig. 3C, arrows in panel f). No such accumulation of mitochondria was observed in the time-matched control cultures (Fig. 3C, panel c).

Contribution of oxidative stress to axonal and myelin damage

To assess the contribution of oxidative stress to axonal damage, we compared the effect of LPS induced oxidative stress with that induced by hydrogen peroxide (H_2O_2), a promoter of free radicals, in the cerebellar culture model. ROS production induced by LPS after 24 h was 3-fold higher than that induced by a low dose of H_2O_2 . Indeed, LPS induced a 36% and 15% increase in iNOS protein expression with respect to control slices and those treated with a low dose of H_2O_2 (Fig. 4A). Furthermore, demyelination was evident in both LPS and H_2O_2 -treated samples, as detected in CNPase Western-blot (Fig. 4A), and by immunofluorescence for NFL and MBP (Fig. 4B). The extensive loss of myelin generated by LPS treatment was associated with greater axonal swelling than in control or H_2O_2 -treated samples (Fig 4B panels f and i). Axonal damage was greater 24 h after the LPS challenge when compared with H_2O_2 treatment, as determined by specific staining for anti-phosphorylated NFH (Fig. 4C).

The microglia activation inhibitors ethyl pyruvate and allopurinol decreased demyelination and axonal damage

To study the effect of microglia activation on axonal damage and demyelination in this model, we tested the effect of the iNOS inhibitor ethyl pyruvate (EP) [16,17]. EP is a stable form of pyruvate, a metabolite with strong anti-oxidant and scavenger activity, which inhibits expression of iNOS. EP inhibits JAK2 phosphorylation, which in turn inhibits the phosphorylation of STAT1 and STAT3 in LPS-stimulated microglia and as a consequence, suppresses the expression of the STAT-responsive genes iNOS and cyclooxygenase-2. In addition, EP reduces LPS-induced ROS production by inhibiting gp91phox transcription

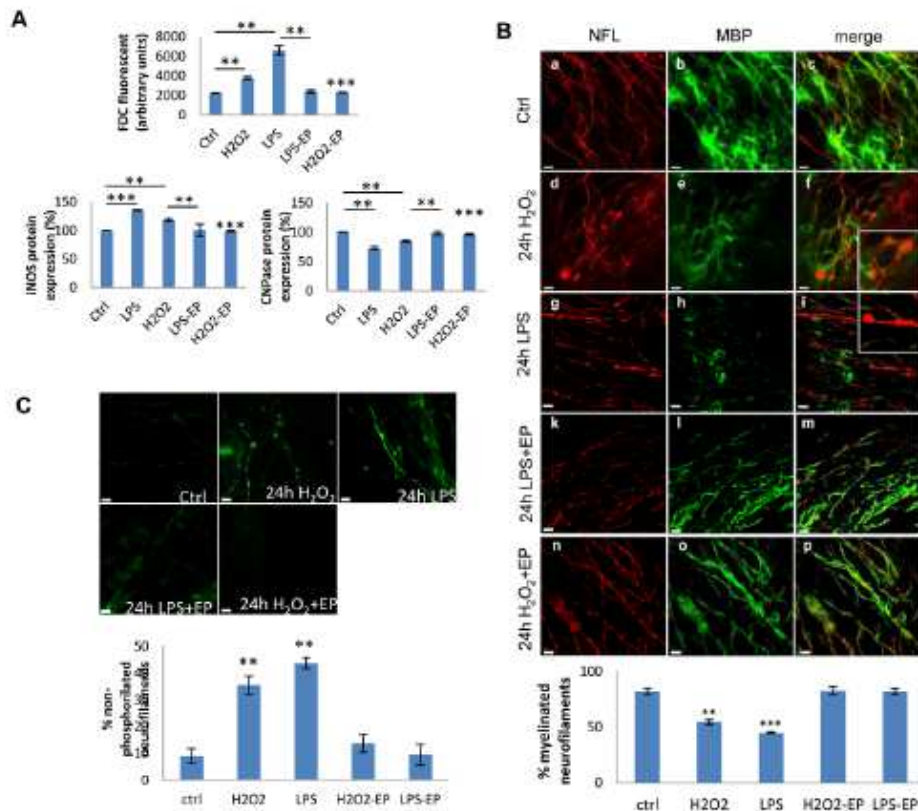


Figure 4. Role of Ethyl pyruvate in preventing microglia activation in cerebellar cultures. A) Comparative effects of LPS, H₂O₂ and Ethyl pyruvate (EP) in ROS production, iNOS expression and CNPs levels: Cerebellar cultures were left untreated [Ctrl] or treated with H₂O₂ (1 mM), LPS (15 µg/ml), LPS plus EP (10 mM), or H₂O₂ plus EP. ROS were measured by spectrofluorometry using H₂DCFDA and expressed as arbitrary units. Total protein was extracted and analyzed in Western blots probed for iNOS and CNPase. The bands were quantified by densitometry, normalized to the total protein and expressed as a percentage with respect to the control. Error bars indicate the standard error. **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001. B) Comparative effects of LPS, H₂O₂ and EP in demyelination and axonal damage in cerebellar cultures: Immunostaining for NFL (red, panels a, d, g, k and n) and MBP (green, panels b, e, h, l and o) in untreated organotypic cultures (control; panels a-c) or those treated for 24 h with H₂O₂ (panels d-f), LPS (panels g-i), LPS plus EP (panels k-m) or H₂O₂ plus EP (panels n-p). Co-localization is shown in the merged panels c, f, i, m and p. Insets show a higher magnification of the areas in panels f and l. Scale bar = 10 µm. The graphic below shows the percentage of myelinated neurofilament. Asterisks indicate the standard error calculated respect to the control. ***P*<0.01 and ****P*<0.001. C) Role of LPS, H₂O₂ and EP in presence of non-phosphorylated neurofilaments (SMI32): SMI32 (green) staining in the same conditions as in B. Arrows indicates SMI32 accumulation in axons. Scale bar = 10 µm. The graph below shows the percentage of non-phosphorylated neurofilament with respect to total neurofilaments in cerebellar cultures stimulated for 24 hrs with LPS. Asterisks indicate the standard error calculated respect to the control (statistical analysis was performed using ANOVA test) ***P*<0.01. doi:10.1371/journal.pone.0054722.g004

and Rac1 activity, suppressing the Rac1-JAK-STAT signaling cascade [16]. Figure 4A shows that in the presence of EP, ROS production induced by LPS returned to levels similar to those of untreated controls, which was associated with decreased iNOS activation. Axonal damage, as determined by the increase in non-phosphorylated NFL, was also reduced to control levels in the presence of EP (Fig. 4C). Moreover, CNPase or MBP protein levels were preserved by EP treatment (Fig. 4A and 4B). In summary, EP decreased demyelination and axonal damage due to the inhibition of microglia activation.

Second, we treated LPS challenged cultures with the xanthine oxidase inhibitor and radical-free scavenger Allopurinol [18]. This compound is a ROS scavenger that does not affect MAPK activation in microglia [18]. We tested different concentration of

Allopurinol in the microglia cell line BV2 treated with LPS and measured the release of pro-inflammatory cytokines and ROS production. Allopurinol significantly decreased ROS levels without significantly modifying IL-1β, IL-6 and TNF-α secretion (data not shown). Cerebellar cultures were pretreated for 2 h with allopurinol using two different concentrations (100 µM and 1 mM) and then stimulated with 15 µg/ml of LPS for 24 h. We found a significant ROS decrease as quantified by H₂DCFDA assay in the cultures treated with allopurinol 1 mM after LPS challenge compared with time-matched cultures stimulated with LPS (Fig. 5A). Moreover, to verify that allopurinol does not interfere with microglia activation we tested IL-1β, IL-6 and TNF-α release by ELISA assay. Allopurinol was not able to block cytokine release induced by LPS to a significant extent when we

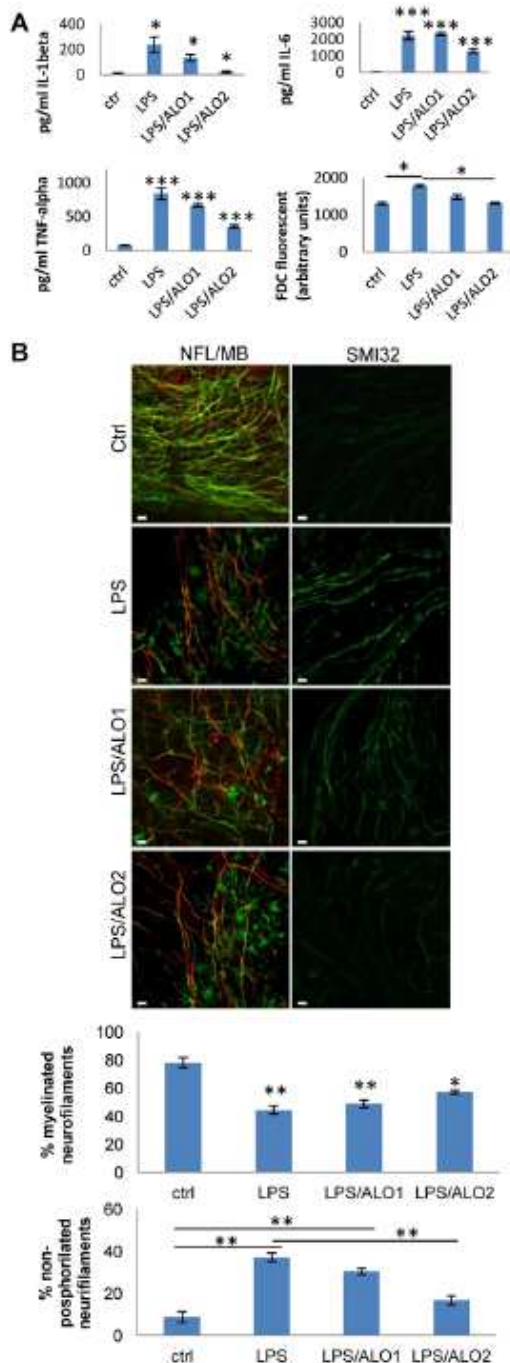


Figure 5. Effects of allopurinol in microglia mediated axonal damage and demyelination. A) Comparative effect of LPS and allopurinol (ALO) in cytokine expression, and ROS production by cultures: cerebellar cultures were treated with LPS in presence or

absence of ALO (ALO1: 100 μ M or ALO2: 1 mM). At 24 h ROS were measured and expressed as arbitrary units and IL-1 β , TNF- α and IL6 release were measured by ELISA. Asterisks indicate the standard error calculated respect to the control. * P <0.05, and *** P . B) Comparative effect of LPS and allopurinol in the induction of axonal damage (non-phosphorylated neurofilaments: Immunostaining for NFL/MBP and non-phosphorylated neurofilaments (SMI32) in cultures using the same condition as in D. Scale bar = 10 μ m. The graph below shows the quantification of demyelinated and non-phosphorylated neurofilaments. Error bars indicate the standard error. * P <0.05, ** P <0.01 (ANOVA test). doi:10.1371/journal.pone.0054722.g005

treated the cultures with 100 μ M of allopurinol. In contrast, allopurinol blocks cytokine release at 1 mM (Fig. 5A). However, when we compared IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels from cultures treated with allopurinol (1 mM) after LPS challenge with time-matched control cultures (without LPS) we found a significant increase of cytokines release (Fig. 5A). These results suggest that allopurinol was not able to block microglia activation completely, even if it did block ROS production. Finally, we assessed the effect of microglia activation modulated by allopurinol on demyelination and axonal damage. After 24 h of treatment with LPS in presence or absence of allopurinol, cultures were stained for neurofilament light (NFL) and MBP (Fig. 5B, left panels). Allopurinol used at 1 mM significantly prevented axonal damage (Fig. 5B, right panels) but did not decrease demyelination (Fig. 5B, see quantification in graphs below).

Blocking TNF- α prevents partially demyelination but not oxidative stress-mediated axonal damage

During brain inflammation, pro-inflammatory cytokines and oxidative stress may differentially contribute to axon and myelin damage. To investigate the contribution of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α to tissue damage, TNF- α activity was inhibited using a blocking recombinant protein (Fc-TNFR1), and the levels of oxidative stress and axonal and myelin damage in cultures were measured. Demyelination was significantly attenuated in cerebellar cultures pretreated with Fc-TNFR1 2 h before the LPS challenge (Fig. 6A), visible as a significant increase in the percentage of myelinated axons in the Fc-TNFR1 group compared to the LPS group (Fig. 6B). We quantified oligodendrocyte cell death by double staining with MBP/Ft. We observed that Fc-TNFR1 treated cultures had a significant decrease of oligodendrocyte death compared to the cultures treated with LPS (Fig. 6B). These effects were present without modification of iNOS expression (Fig. 6C). In summary, in the cerebellar culture model of neuroinflammation, myelin damage and oligodendrocyte loss were promoted by TNF- α .

Role of interferon-beta therapy in preventing oxidative stress-mediated axonal damage

Interferon-beta (IFN- β) is the most common treatment for MS, with a pleiotropic mechanism of action, preventing CNS damage. However, the precise role of IFN- β in controlling oxidative stress in MS is uncertain, particularly given that type I IFN activates iNOS in monocytes and promotes ROS generation [19,20], while it can also downregulate iNOS expression in other settings [21]. First, we assessed the effects of IFN- β in the release of proinflammatory cytokines by LPS. Cytokine release was significantly attenuated in presence of IFN- β (Fig. 7A). Specifically, IFN- β has a more profound and early effect on IL-1 β than on IL-6 and TNF- α release. Furthermore, cultures treated with IFN- β had significantly less axonal damage, as revealed by a reduction in the

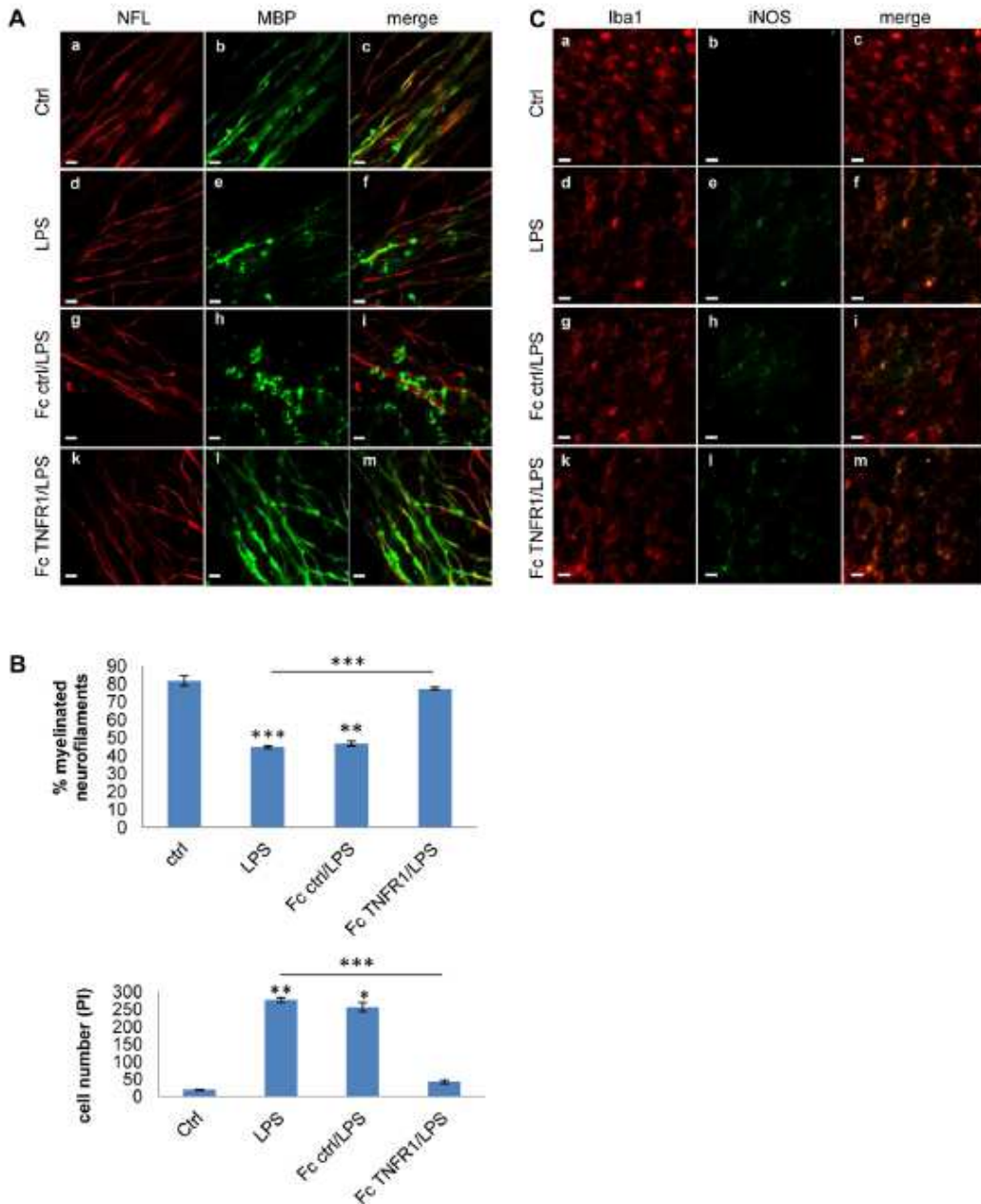


Figure 6. TNF- α blockade modulates microglia activation and demyelination. A) Role of TNF α blockade after LPS stimulation in demyelination of cerebellar cultures: Immunofluorescence for NFL (red) and MBP (green) in cultures untreated (ctrl, panels a-c), cultures treated with LPS (panels d-f), LPS plus control Fc (panels g-i) or LPS plus Fc-TNFR1 (15 μ g/ml, panels k-m) for 24 h. Scale bar = 5 μ m B) The graph shows the percentage of demyelinated neurofilaments (upper graph) and the number of death oligodendrocytes (PI/MBP-positive cells) (bottom graph). Asterisks indicate the standard error calculated respect to the control or LPS-treated cultures. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ (ANOVA test). C) Role of TNF- α blockade in microglia activation: Immunostaining for Iba1 (red) and iNOS (green) in the same condition as in A. Scale bar = 5 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0054722.g006

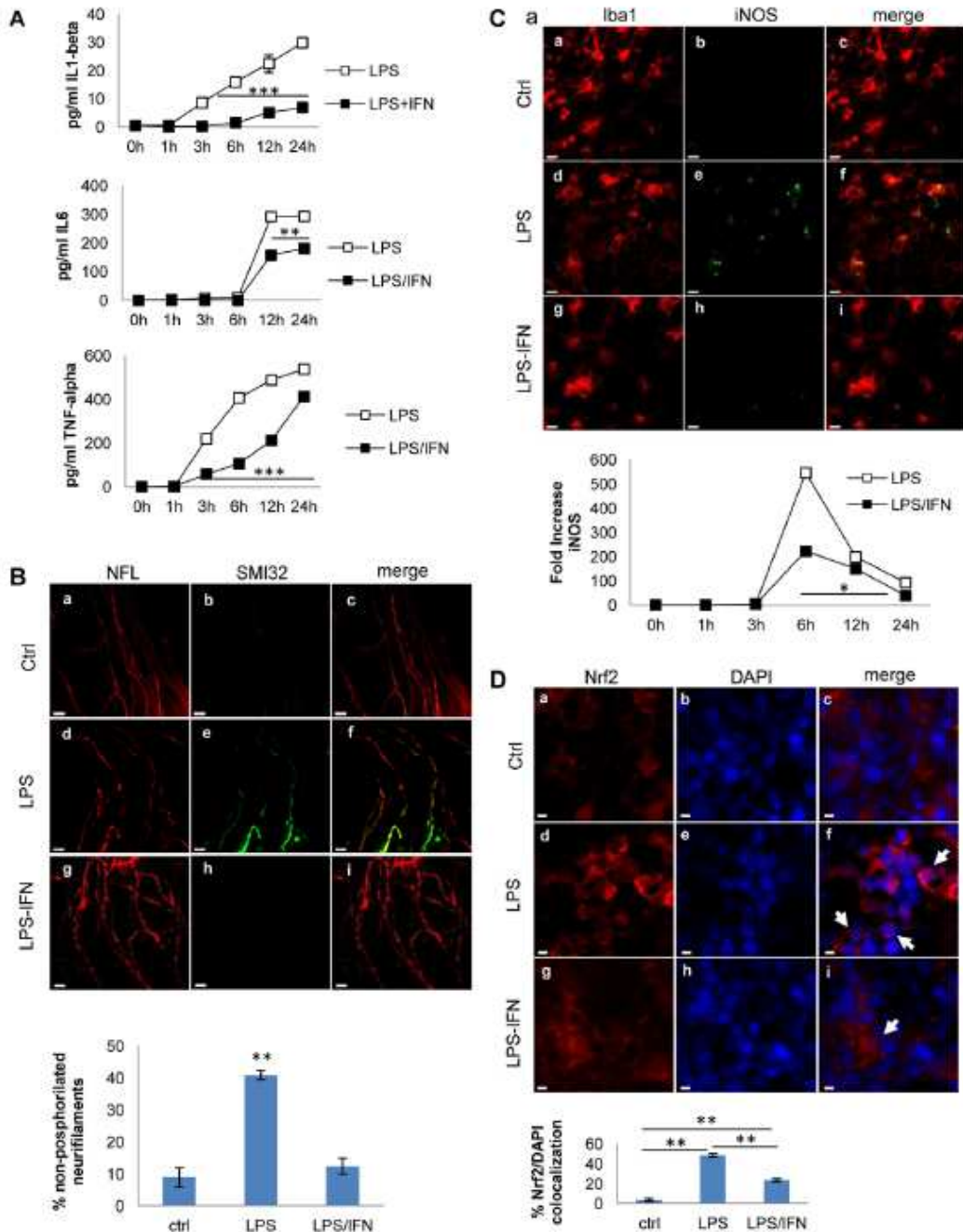


Figure 7. IFN-beta decreases microglia activation, cytokine release, oxidative stress and prevents axonal damage. A) IL-1 β , TNF- α and IL-6 release in cerebellar cultures. Slices were treated with IFN- β for 24 h and then stimulated with LPS (15 μ g/ml) for different periods of time (0, 1, 3, 6, 12, 24 h). IL-1 β , TNF- α and IL-6 were quantified by ELISA. Cytokine release into the medium is expressed as pg/ml and the error bars indicate the standard error. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. B) Effects of IFN- β in LPS induced axonal damage: Immunostaining for NFL (red) and SMI32 (green) in cultures without LPS treatment (ctrl panels a-c), treated with LPS (panels d-f), or LPS plus IFN- β for 24 h (panels g-i). Scale bar = 10 μ m. The graph

below shows the percentage of non-phosphorylated neurofilament with respect to total neurofilaments in cultures stimulated with LPS and treated with IFN- β . C) Effects of IFN- β in microglia activation and iNOS expression: Immunofluorescence staining for Iba1 (red) and iNOS (green) in the same conditions as B). iNOS levels were quantified by qPCR from cultures treated with LPS or LPS plus IFN- β ; the graphs shown the fold increase over the basal values (-), normalized to the expression of the HPR1 housekeeping gene. Error bars indicate the standard error. * $P < 0.05$. D) Effects of IFN- β in Nrf2 nuclear translocation: Immunostaining for Nrf2 (red) and DAPI (blue) in cultures without LPS treatment (ctrl, panels a-c), treated with LPS (panels d-f), or LPS plus IFN- β for 24 h (panels g-i). Arrows indicate Nrf2 accumulation in the nucleus. Representative images of double staining are shown. Error bars indicate the standard error. ** $P < 0.01$. Scale bar = 5 μ m. ANOVA test was used to determine statistical significance. doi:10.1371/journal.pone.0054722.g007

percentage of non-phosphorylated neurofilaments in cultures treated with IFN- β after LPS challenge (Fig. 7B).

In order to assess the effect of IFN- β on oxidative stress, we analyzed iNOS and Nrf2 expression. Pretreatment with IFN- β prior to the LPS challenge reduced LPS-induced iNOS expression, as determined both by RT-PCR (Fig. 7C) and by increasing the protein levels in the tissue and translocation to nucleus (Fig. 7D). Nrf2 is a transcription factor that regulates the expression of many phase II detoxifying and antioxidant enzymes. The increase of Nrf2 is a molecular sensor of oxidative stress and its decrease would suggest reduced oxidative stress. Thus, we observed that LPS-induced oxidative stress triggers translocation of Nrf2 in the nucleus, and that IFN- β treatment induced 50% decrease in Nrf2 translocation (Fig. 7D). Taken together, these results indicate that IFN- β displays an anti-oxidant and anti-inflammatory role in the mice cerebellar model and also highlights the usefulness of this model for monitoring the effects of MS therapies.

Discussion

The LPS model of neuroinflammation in cerebellar cultures [22] recapitulates several events that occur during brain inflammation, including microglia activation followed by cytokine release and oxidative stress, demyelination and axonal damage. Using this model we have evaluated the effect of microglia activation on demyelination and axonal damage in cerebellum tissue. Moreover, we have analyzed whether the murine organotypic culture model represents an effective tool to study the effects of drugs used in neuroinflammatory diseases by using IFN- β as an example. Our results indicate that LPS induced microglia activation in organotypic cultures, as observed by presence of microglial cells with amoeboid shape that expressed MHC-II and OX42, the release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α and the induction of oxidative stress. Microglia activation was associated with oligodendrocyte death and myelin and axonal damage. Demyelination occurs in cerebellar cultures challenged with LPS, although to a lesser extent than in models of demyelination induced by lysocleithin [23], passive transfer of anti-MOG antibodies in cerebellar cultures [24], or LPS challenge to optic nerve cultures [15]. We need to keep in mind that cerebellar tissue appears to be more sensitive to oxidative damage than other brain regions [25]. Cerebellar cultures preserve to a large extent the structure of the brain tissue, and all the cell populations of interest (microglia, astrocytes, neurons and axons, myelin and oligodendrocytes) when compared with spinal cord, retina or hippocampus cultures. The analysis of the effects of neuroinflammation elicited by LPS facilitates dissection of the pathogenic process present in brain inflammatory diseases. *In vivo*, LPS injection in the spinal cord has been shown to induce significant immune cell recruitment to the site of injection, with prominent demyelination that develops over 2 weeks and to a lesser extent axonal damage, followed by remyelination by Schwann cells 4 weeks later [26]. Although the hematogenous inflammation typical of MS and other inflammatory brain diseases does not develop in this model, the effect of activating the innate immune system within the brain is recapitulated by the presence of

microglia activation, which appears to be critical for the long-term axonal damage in MS and degenerative diseases [27].

In the cerebellar cultures stimulated with LPS, we observed ROS production and iNOS expression in activated microglia indicating induction of oxidative stress. LPS activates microglia and astrocytes by binding to TLR4, promoting the induction of iNOS, which in turn produces ROS [28]. Activation of microglia and astrocytes occurs at different stage in several neurodegenerative diseases. In experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), microglia proliferate at the initial stage while astrocytes start to respond more markedly at the late recovery stage [29]. In general, activated astrocytes also express iNOS and the levels of iNOS observed in the organotypic cultures challenged with LPS probably also depend on astrocytes. Oligodendrocytes and myelin are highly sensitive to NO, which provokes the deregulation of the mitochondrial electron transport chain in association with the translocation of the apoptosis inducing factor (AIF) [30] and the production of peroxynitrite [31]. The reduction, but not complete suppression, of demyelination by iNOS inhibitors suggests that oligodendrocytes are damaged by other mechanisms triggered through the activation of TLR4 by LPS. Indeed, TNF- α and IL-1 β appear to mediate oligodendrocyte damage in mixed cultures [15,32]. The requirement of a mixed glia environment suggests that cytokines impair the glutamate-buffering capacity of astrocytes [33].

To evaluate the contribution of microglia activation on demyelination and axonal degeneration we also may use of chemical inhibitors of microglia activation such as EP or allopurinol. Axonal damage was elicited by LPS-mediated microglia activation as well as by H₂O₂-promoted oxidative stress. Inhibition of iNOS expression by EP prevented myelin and axonal damage whereas allopurinol preferentially prevented axonal loss, but demyelination persists. In particular, allopurinol reduced significantly the production of ROS and slightly the amount of cytokines. The amount of cytokines still present after allopurinol pre-treatment (>500 pg/ml for TNF- α , 100 pg/ml for IL-6 and 50 pg/ml for IL-1 β) is sufficient to induce demyelination in the cultures. Moreover, in the present model we found that following inhibition of TNF- α , myelin damage and oligodendrocyte loss were promoted by pro-inflammatory cytokines. However, we did not blocked other pro-inflammatory cytokines and for this reason we cannot rule out the contribution of other pro-inflammatory cytokines to tissue damage.

Oxidative stress may contribute to axonal damage via several mechanisms, including the impairment of mitochondrial function due to the accumulation of mutations in mtDNA. In turn, this leads to energetic failure, protein and lipid oxidation, and microtubule degradation, thus impairing functions such as axonal transport and structural support [1,3,34]. The axonal swelling and mitochondria accumulation were pertinently present in the model and were consistent with a disruption of microtubules by oxidative stress and the subsequent blockade of axonal transport [6]. Moreover, demyelination enhances this effect due to the lack of metabolic support provided by myelin in long axons [35,36].

Finally we have investigated the effect of IFN- β , a firmly established first-line therapeutic agent for MS that prevents CNS

damage. Our model indicates that IFN- β decrease both the expression of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress, as such contributing to axonal preservation. The occurrence of oxidative damage coincided with increased levels of antioxidant enzymes in cerebellar cultures treated with IFN- β , suggesting that the antioxidant capacity is overwhelmed during a neuroinflammatory attack [37]. Several studies have also shown that IFN- β inhibits cytokine-induced NO- or iNOS-synthesis in astrocytes, which may contribute to its clinical efficacy [21,38,39]. In contrast, Lieb et al [40] have shown no inhibitory effects of IFN- β on iNOS in rat microglial cells. Moreover, studies in murine macrophages have shown that IFN- β increased the iNOS activity, thereby enhancing intracellular NO activity [20]. In our culture system, IFN- β reduced iNOS expression supporting the protective effect of IFN- β from oxidative stress. Endogenous antioxidant enzymes are regulated by the transcription factor Nrf2 and upon exposure to ROS, Nrf2 translocates to the nucleus where it binds to antioxidant response elements in genes coding for antioxidant enzymes [41]. In organotypic cultures challenged with LPS, translocation of Nrf2 into the nucleus was decreased when the cultures were treated with IFN- β . We hypothesize that the decrease in nuclear translocation of Nrf2 observed is probably due to the ability of IFN- β to prevent oxidative stress.

In summary, our data underscore that in cerebellar organotypic cultures challenged with LPS, microglial activation is sufficient to release pro-inflammatory cytokines and induce oxidative stress, damaging myelin and axons, even in the absence of lymphocytes and hematogenous macrophages. These events were recapitulated and dissected in this model, providing a tool to study tissue damage MS and other inflammatory brain diseases, that might reflect the progression of the disease in the absence of overt inflammatory infiltrates. Moreover, this model permits the mechanistic study of new treatments for MS and other neuroinflammatory disorders.

Supporting Information

Figure S1 LPS induces microglia activation in mouse cerebellar cultures. A) dose-response curve of IL-1 β release measured by ELISA. Cerebellar cultures were stimulated with four different concentrations of LPS for 24 h (5, 10, 15 and 20 μ g/ml). B) IL-1 β , TNF- α and IL-6 release in cerebellar cultures. Slices were stimulated with LPS (15 μ g/ml) for different periods of time (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h) and then analyzed by ELISA. Cytokine release into the medium is expressed as pg/ml. Error

bars indicate the standard error. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 (Student's *t*-test). C) Immunostaining for markers of microglia activation MHCII (a) and OX42 (b). Cultures were stimulated with LPS (15 μ g/ml) for 24 h and then stained with antibodies against MHCII and OX42. Scale bars = 50 μ m (a) and 10 μ m (b).

(TIF)

Figure S2 Demyelination and impaired axonal transport were maintained after 24 h of LPS treatment.

Cerebellar cultures were stimulated with LPS (15 μ g/ml) for 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h, and stained for NH (red) and MBP (green). The graph shows the number of PI-MBP-positive cells. Higher magnification images of white (g) and grey (h) matter in cultures treated with LPS. Scale bar = 100 μ m (panels a-f) and 10 μ m (panels g and h). B) Cerebellar cultures were incubated for 24 h in the presence (LPS) or absence (Ctrl) of LPS (15 μ g/ml). Immunocytochemistry was performed to detect activated (cleaved) caspase-3 labeling. Graphs show the percentage of cell death by quantifying the co-localization of active Casp3 immunofluorescence in conjunction with Hoechst 33258 nuclear staining. Asterisk indicates the standard error (calculated respect to the control). *P<0.05, **P<0.01 (Student's *t*-test). Representative images of double staining for active Casp3 (green) and Hoechst (blue) are shown. Scale bar = 5 μ m.

(TIF)

Figure S3 Microglial activation induces oligodendrocyte death in mouse cerebellar cultures.

A) Cerebellar cultures were treated with LPS (15 μ g/ml) for 24 h and then immunostained for MBP (green) or NeuN (blue) and counterstained with propidium iodide (red). The graph shows the number of PI-MBP-positive cells. Higher magnification images of white (g) and grey (h) matter in cultures treated with LPS. Scale bar = 100 μ m (panels a-f) and 10 μ m (panels g and h). B) Cerebellar cultures were incubated for 24 h in the presence (LPS) or absence (Ctrl) of LPS (15 μ g/ml). Immunocytochemistry was performed to detect activated (cleaved) caspase-3 labeling. Graphs show the percentage of cell death by quantifying the co-localization of active Casp3 immunofluorescence in conjunction with Hoechst 33258 nuclear staining. Asterisk indicates the standard error (calculated respect to the control). *P<0.05, **P<0.01 (Student's *t*-test). Representative images of double staining for active Casp3 (green) and Hoechst (blue) are shown. Scale bar = 5 μ m.

(TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Ali Taubes for the English review.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AdP PV JC. Performed the experiments: AdP RM SR BFD MV OE NE. Analyzed the data: AdP KV JC PV. Contributed reagents/materials/analysis tools: KV ER JC. Wrote the paper: AdP KV JC PV.

References

- Coleman M (2005) Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 6: 889–898.
- Coleman MP, Perry VH (2002) Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *Trends Neurosci* 25: 532–537.
- Beal MF (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* 58: 495–505.
- Su KG, Banker G, Bourdette D, Forte M (2009) Axonal degeneration in multiple sclerosis: the mitochondrial hypothesis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9: 411–417.
- Gilgun-Sherki V, Melamed E, Offen D (2001) Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40: 959–975.
- Roediger B, Avramis JF (2003) Oxidative stress induces axonal beading in cultured human brain tissue. *Neurobiol Dis* 13: 222–229.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37: 173–182.
- Dassan I, Antikainen MS, Sorcio C (1997) Purkinje cell survival and axonal regeneration are age dependent: an in vitro study. *J Neurosci* 17: 3710–3726.
- Stanley B, Post J, Hensley K (2012) A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 9: 115.
- Miron VE, Lublin SK, Darlington BJ, Jarjour AA, Solven B, et al. (2010) Fingolimod (FTY720) enhances remyelination following demyelination of organotypic cerebellar slices. *Am J Pathol* 176: 2682–2694.
- Zhang H, Jarjour AA, Boyd A, Williams A (2011) Central nervous system remyelination in culture – a tool for multiple sclerosis research. *Exp Neurol* 230: 138–148.
- Martinez-Foreiro I, Garcia-Manoz R, Martinez-Pasamar S, Inoges S, Lopez-Diaz de Cerio A, et al. (2008) IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 38: 576–586.
- Schneider P (2000) Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor: Fc chimeric proteins. *Methods Enzymol* 322: 325–345.
- Cavaliere F, Dinkel K, Reymann K (2005) Microglia response and P2 receptor participation in oxygen/glucose deprivation-induced cortical damage. *Neuroscience* 136: 615–623.
- Sherwin C, Fern R (2005) Acute lipopolysaccharide-mediated injury in neonatal white matter glia: role of TNF- α , IL-1 β , and calcium. *J Immunol* 175: 155–161.
- Kim HS, Cho IH, Kim JE, Shin YJ, Jeon JH, et al. (2008) Edyl pynovate has an anti-inflammatory effect by inhibiting ROS-dependent STAT signaling in activated microglia. *Free Radic Biol Med* 45: 950–963.

17. Kao KK, Fink MP (2010) The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of edyl pyrazole and related compounds. *Biochem Pharmacol* 80: 151–159.
18. Yang GS, Lee HM, Lee JY, Kim JA, Lee SJ, et al. (2007) Reactive oxygen species and p17phox activation are essential for the Mycobacterium tuberculosis-induced pro-inflammatory response in murine microglia. *J Neuroinflammation* 4: 27.
19. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173: 17–26.
20. Yao SY, Ljunggren-Rose A, Strawn CW, Mitchell WM, Strain S (2001) Regulation by IFN- β of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12/p40 in murine macrophages cultured in the presence of Chlamydia pneumoniae antigens. *J Interferon Cytokine Res* 21: 137–146.
21. Hua LL, Liu JS, Brossmer CF, Lee SC (1998) Selective inhibition of human glial inducible nitric oxide synthase by interferon- β : implications for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 43: 384–387.
22. Kim JY, Shen S, Diesz K, He Y, Howell O, et al. (2010) HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage. *Nat Neurosci* 13: 180–189.
23. Birghauer E, Rao TS, Webb M (2004) Iysolectin induces demyelination in vitro in a cerebellar slice culture system. *J Neurosci Res* 78: 157–166.
24. Harzer MD, von Budingen HC, Stoppini L, Alliod G, Poudy S, et al. (2009) Live imaging of remyelination after antibody-mediated demyelination in an ex-vivo model for immune mediated CNS damage. *Exp Neurol* 216: 431–438.
25. Vladimirova O, O'Connor J, Cahill A, Alder H, Bannister C, et al. (1998) Oxidative damage to DNA in plaques of MS brains. *Mult Scler* 4: 413–418.
26. Feltz PA, Woolson AM, Fernando HR, Asquith S, Gregson NA, et al. (2005) Inflammation and primary demyelination induced by the intraspinal injection of lipopolysaccharide. *Brain* 128: 1649–1666.
27. Moreno B, Jukes JP, Vergam-igitaray N, Errea O, Villalada P, et al. (2011) Systemic inflammation induces axon injury during brain inflammation. *Ann Neurol* 70: 932–942.
28. Lehmedi S, Lachaux C, Barizi S, Lefebvre S, Folein PL, et al. (2002) The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 22: 2478–2486.
29. Masumoto Y, Ohnishi K, Fujiwara M (1992) Microglial and astroglial reactions to inflammatory lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat central nervous system. *J Neuroimmunol* 37: 23–33.
30. Bauli O, Li J, Zhang Y, Neve RL, Volpe JJ, et al. (2004) Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *Eur J Neurosci* 20: 1713–1726.
31. Jack C, Aniel J, Bruck W, Kuhlmann T (2007) Contrasting potential of nitric oxide and peroxynitrite to mediate oligodendrocyte injury in multiple sclerosis. *Glia* 55: 926–934.
32. Li J, Ramenaden ER, Peng J, Kohs H, Volpe JJ, et al. (2008) Tumor necrosis factor alpha mediates lipopolysaccharide-induced microglial toxicity to developing oligodendrocytes when astrocytes are present. *J Neurosci* 28: 5321–5330.
33. Takahashi JJ, Giuliani F, Power C, Imai Y, Yong VW (2003) Interleukin-1 β promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann Neurol* 53: 588–595.
34. Cosmeirman AE, D'Onofrio TG, Andrews AM, Weiss PS (2006) A physical model of axonal damage due to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5262–5266.
35. Nave KA, Trapp BD (2008) Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci* 31: 555–561.
36. Irvine KA, Blakemore WF (2008) Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain* 131: 1464–1477.
37. van Horsen J, Schreiber G, Dresshage J, Haxel T, Dijkstra CD, et al. (2008) Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic Biol Med* 45: 1729–1737.
38. Guthikonda P, Baker J, Mattson DH (1998) Interferon- β -1-b (IFN- β) decreases induced nitric oxide (NO) production by a human astrocytoma cell line. *J Neuroimmunol* 82: 133–139.
39. Stewart VC, Girosamoni G, Land JM, McDonald WI, Clark JB, et al. (1997) Pretreatment of astrocytes with interferon- α /beta impairs interferon- γ induction of nitric oxide synthase. *J Neurochem* 68: 2547–2551.
40. Lieb K, Engels S, Flebich BL (2003) Inhibition of LPS-induced iNOS and NO synthesis in primary rat microglial cells. *Neurochem Int* 42: 131–137.
41. de Vries HE, Witte M, Hondius D, Rozemuller AJ, Drukarch B, et al. (2008) Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? *Free Radic Biol Med* 45: 1375–1383.

