



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# **Estudi del paper de la disfunció mitocondrial en neurones CCK i PVALB**

**Andrea Urpi Badell**  
**2022**

Institut de Neurociències  
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia  
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Memòria de tesi doctoral presentada per Andrea Urpi Badell per  
tal d'optar al títol de doctora en Neurociències amb menció  
internacional pel programa de doctorat en Neurociències UAB

Director:  
**Dr. Albert Quintana Romero**

Directora:  
**Dra. Elisenda Sanz Iglesias**

Tutor:  
**Dr. Juan Hidalgo Pareja**

Doctoranda:  
**Andrea Urpi Badell**







## Agraïments

Arribar a presentar una tesi doctoral, quan vaig entrar al laboratori fa 6 anys dient que volia fer ciència però no un doctorat, té molt a veure amb les dues grans persones que remenen les cireres. Eli i Albert, heu aconseguit crear una família científica més que un laboratori de recerca gràcies a la vostra passió per tot el que feu, l'optimisme desbordant per qualsevol projecte i la dedicació infinita sacrificant hores de son. Estic molt agraïda d'haver-vos tingut com a directors de tesi, m'heu ajudat a néixer com a investigadora i créixer com a persona, sempre amb paraules d'ànim en els moments que no veia la llum. Gràcies!

Dra. Prada, Pati pels compis, has estat la clau en aquesta aventura del doctorat, en tu he trobat una amiga incondicional que sempre té les paraules justes en cada moment. Ets la combinació perfecte entre la saviesa d'una dona de 70 anys amb la bogeria d'una adolescent. Les dues sabem que no veure'ns cada dia només farà que tinguem més ganes de xerrar (i rajar) i que aquesta amistat va per llarg. Gràcies!

El bon ambient del QuintanaLab és gràcies a les magnífiques persones que en formen part o que han passat per aquí. Mai tinc la sensació d'anar a treballar perquè sé que hi trobaré riures i bon rotllo, i de tant en tant una mica de ciència. Cadascú de vosaltres fa que el laboratori sigui un lloc únic on sentir-se com a casa, estic molt contenta de formar part d'aquesta família. Patrizia, siempre aportando un toque de sensatez y cariño italiano. Emma, la bogeria feta persona amb mil vivències surrealistes amb un bon consell preparat i ànims per seguir endavant. Pablo, estuvimos juntos des de los inicios superando momentos buenos y no tan buenos pero siempre dispuesto a escuchar. Les següents a la llista en la gloria i alegria d'escriure la tesi sou la Laura Sánchez i la Mel, molts ànims noies que el final arriba! Alex i Irene, recordo tots els moments viscuts al despatx amb un somriure a la cara, sou uns grans professionals i em vaig sentir molt acollida per vosaltres quan tot això començava. Les super postdocs Laura Cutando i Anna Pallé, sabeu més bé que ningú la vostra gran aportació a aquesta tesi i la meva gratitud immensa per la vostra ajuda,

## Agraïments

per mi ha estat un plaer planificar experiments juntes i aprendre cada dia dels vostres infinits coneixements. Mònica, Adán, Marcos y Marta os deseo lo mejor en el QuintanaLab y una próspera vida científica. Isa, la voz de la sabiduría y la sensatez en el laboratorio, sabes que eres mi alter ego del orden en el laboratorio. Roser, com m'agrada la teva manera despreocupada d'afrontar la vida. Fab, the best party and dinner organizer ever, thank you for your optimistic point of view in life. Als de fisio, Carla, Patri i Kevin, companys d'aventures en el món del doctorat, ànims, que ja us queda poc! També vull agrair tot el personal tècnic que m'ha aconsellat i ajudat en els diferents experiments, Núria, Saioa, Javier, Cris, Neus, Toni, Silvia i sobre tot la Mar, gràcies pels teus consells i humanitat. Gràcies a tots!

L'estada a Davis enmig de l'escriptura de la tesi i d'una pandèmia mundial ha estat un miratge per agafar forces. Estic realment agraïda a l'acollida de tot el SimoLab i LaTorreLab però especialment al Sergi i l'Anna per no només obrir-me les portes dels seus laboratoris sinó també les de casa seva. Durant els 3 mesos a Davis em va descobrir els costums dels americans i em va treure a passejar per descobrir el Golden State. I would like to thank Jisoo for giving me the opportunity to visit Yosemite Park with her fantastic family, but also thanks to Mikaela, Keiko, Raenier, Adam and Elizabeth for your patience with me, for teaching me new techniques and for such funny lunch conversations. En aquesta aventura americana vull agrair a la Maria les hores de conversa, sopars i viatges que vam fer, va ser un plaer tornar a coincidir després de 10 anys. En aquí tornen a aparèixer l'Anna i l'Emma, com a americana i semi-americana, respectivament, que gràcies a la vostra hospitalitat i amiatat vaig poder descobrir Califòrnia, també a la família del Gabriel està clar. Thank you all!

Si algú és mereix totes les lletres de la paraula GRÀCIES és l'Àlex. Realment ets la persona que més m'ha ajudat, animat i s'ha de dir clar, qui més m'ha patit en aquesta última etapa. Segurament en molts moments m'haguessis enviat a pastar fang però tu sabies què dir-me per tranquil·litzar-me i ajudar-me a seguir endavant. Sempre

has dit que una part d'aquesta tesi també és teva, no només per les aportacions científiques sinó perquè sense el teu bon humor hagués estat molt més complicat. Després de tants mesos ja estem més a prop de tornar a les aventures del món exterior. Gràcies!

Per la família sempre ha estat difícil entendre què he estat fent durant 5 anys, si treballar, estudiar o perdre el temps. Les preguntes recurrents eren: i quan acabes això que estàs fent? I després què faràs? Mira que és complicat tot aquest món! Teniu raó, segueixo a la universitat com a estudiant però cobrant un sou i fent una quantitat d'hores que només s'entenen si parlem de vocació. Tot i així us vull agrair el suport i l'amor que sempre em doneu en tot el que faig, avis, tiets, cosines, iaia i tiet. Però especialment a la mama i el Bep, per animar-me a seguir endavant cada dia i donar-me la tranquil·litat que necessitava aquests últims mesos, espero deixar de ser un paràsit a Vilafranca d'ara en endavant. També gràcies papa per involuntàriament fer-me interessar per la recerca i donar-me ales en tot allò que m'he proposat. I no m'oblido de la Lola, la millor companya de despatx i de quarantena. Gràcies!

Als amics de Vilafranca (Judith, Miriam, Dani, Rai, Ferran, Aleix i Alba) que encara sense entendre ben bé què implica fer un doctorat, les nostres trobades, cada vegada més diürnes que nocturnes, m'han ajudat a desconnectar i relativitzar els problemes, dale nenes! Gràcies!

Escriure la tesi ha estat un camí molt molt llarg, ningú l'esperava tan llarg, ni jo. Sort de petites ajudes que m'han anat "alimentant" com la Nutella o els Risetos, els sons del volcà de la Palma o cançons a piano de Disney que em tranquil·litzaven, mentre que la Rigo i Màxima em mantenien atenta. Una menció especial al sci-hub, proveïdor desinteressat d'articles sense el qual faltarien la meitat de les referències d'aquesta tesi. D'alguna manera els ratolins són els protagonistes d'aquesta tesi, sense ells cap dels experiments haguessin estat possibles. M'agradaria pensar que la ciència avança per substituir els animals en la recerca en favor d'altres sistemes que



## Agraïments

no impliquin sotmetre animals en l'experimentació. Llavors sí que podríem considerar als humans com l'espècie superior que ens creiem. Gràcies!

Fer aquesta tesi ha estat possible gràcies al finançament de la Generalitat de Catalunya a través de l'AGAUR amb la beca 2018FI\_B\_00184, a l'European Research Council a través del projecte Stg 2014-638106 i a l'obra Social la Caixa a través del projecte HR20-00896.

Els que em coneixeu bé sabeu que soc dona de poques paraules, i menys d'expressar sentiments, en aquestes línies espero haver plasmat la meva gratitud per tots aquells que heu aparegut en el camí del doctorat i que amb un consell o altre heu ajudat a fer-ho possible.

# Índex

LLISTAT D'ABREVIACIONS I SIGLES .....	I
RESUM .....	VII
SUMMARY .....	IX
INTRODUCCIÓ.....	1
1. El mitocondri .....	3
1.1. Origen del mitocondri .....	3
1.2. Estructura i dinàmica mitocondrial .....	4
1.3. Fosforilació oxidativa.....	5
1.4. Processos biològics amb participació mitocondrial .....	8
1.5. Paper del mitocondri en el sistema nerviós central.....	10
2. Malalties mitocondrials.....	11
3. La síndrome de Leigh.....	14
3.1. Història, prevalença i prognòsis de la SL .....	14
3.2. Signes clínics de la SL.....	15
3.3. Etiologia i manifestacions genètiques de la SL.....	17
3.4. Diagnòstic neuropatològic de la SL .....	19
3.4.1. Ressonància magnètica.....	19
3.4.2. Manifestacions neuropatològiques en la SL.....	20
3.5. Diagnòstic genètic i bioquímic de la SL .....	22
3.6. Mecanismes cel·lular involucrats en la progressió de la SL .....	24
3.7. Tractaments per la SL.....	26
4. Models animals de la SL .....	28
4.1. Ratolí Ndufs4KO .....	32
5. Còrtex cerebral.....	36
5.1. Formació del còrtex: corticogènesi .....	37
5.2. Diferents àrees corticals descrites en el cervell de ratolins .....	40
5.2.1. Còrtex motor.....	41

## Índex

5.2.2. Còrtex somatosensorial .....	42
5.3. Principals projeccions del còrtex .....	43
6. Dues poblacions neuronals corticals .....	45
6.1. Neurones corticals amb expressió de colecistocinina .....	46
6.1.1. Ratolins model relacionats amb la colecistocinina .....	47
6.2. Neurones corticals amb expressió de parvalbúmina .....	50
6.2.1. Ratolins model relacionats amb la parvalbúmina .....	51
HIPÒTESI I OBJECTIUS .....	53
MATERIAL I MÈTODES .....	57
1. Animals .....	59
1.1 Extracció de DNA genòmic .....	59
1.2 Genotipatge dels ratolins transgènics .....	60
1.3 Generació de ratolins transgènics amb deleció condicional del gen <i>Ndufs4</i> en neurones CCK o PVALB .....	62
1.4 Generació de ratolins transgènics amb marcatge específic dels ribosomes citosòlics en les neurones CCK .....	63
2. Ressonància magnètica .....	64
2.1 Anàlisi de l'anatomia cerebral .....	65
2.2 Relaxometria T2, imatges ponderades en T2 i T2* .....	66
2.3 Determinació del tensor de difusió .....	67
2.4 Determinació del flux sanguini (anàlisi de perfusió) .....	67
3. Conducta animal .....	68
3.1 Test del <i>rotarod</i> .....	69
3.2 Test del llistó vertical .....	69
3.3 Conducta de <i>claspig</i> .....	70
3.4 Test del laberint en "Y" .....	70
3.5 Test d'intrusió de ratolí desconegut .....	71
3.6 Test de camp obert .....	71
3.7 Test d'enterrament d'objectes .....	72
3.8 Conducta d'excavació .....	72

3.9	Test d'interacció social .....	72
3.10	Test d'exploració d'un objecte nou.....	73
3.11	Pletismografia de cos sencer .....	74
3.12	Test del llistó horitzontal.....	74
3.13	Test de Von Frey.....	75
4.	Estudi de la conducció nerviosa .....	76
5.	Histologia i immunofluorescència.....	77
6.	Anàlisi de les capes corticals .....	78
7.	Anàlisi d'expressió gènica en una població neuronal específica.....	79
7.1	Obtenció de mostres cerebrals del còrtex parietal i còrtex temporal .....	79
7.2	Aïllament de ribosomes citosòlics específics de la població neuronal CCK (metodologia RiboTag).....	80
7.3	Extracció, quantificació i control de qualitat d'RNA.....	83
7.4	Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant qRT-PCR.....	83
7.5	Seqüenciació massiva del transcriptoma (RNA-Seq) i anàlisi bioinformàtic.....	85
8.	Anàlisi estadístic .....	86
	RESULTATS.....	87
1.	Anàlisi de la neuroinflamació cortical en ratolins amb deficiència constitutiva del gen <i>Ndufs4</i> .....	89
2.	Dissecció de les poblacions neuronals corticals implicades en la neuroinflamació causada per deficiència del gen <i>Ndufs4</i> .....	90
3.	Alteracions estructurals del còrtex en ratolins amb deficiència del gen <i>Ndufs4</i> en neurones que expressen <i>Cck</i> .....	91
3.1	Reducció del gruix cortical i engrandiment dels ventricles en ratolins Cck:Ndufs4cKO d'edat avançada.....	92
3.2	Hiperintensitat cortical detectada per mapes de T2 en ratolins Cck:Ndufs4cKO .....	93
3.3	Els ratolins Cck:Ndufs4cKO mostren una disminució de la difusió en còrtex, estriat i tàlem .....	99
3.4	Absència d'alteracions en el flux sanguini i d'hemorràgies en el cervell dels ratolins Cck:Ndufs4cKO.....	103

## Índex

4. Caracterització del fenotip conductual en ratolins amb deficiència del gen <i>Ndufs4</i> en neurones CCK .....	104
4.1 Reducció en la supervivència i evidència de conducta de <i>clasp</i> ing en ratolins Cck:Ndufs4cKO .....	105
4.2 Pèrdua de coordinació motora i equilibri en ratolins Cck:Ndufs4cKO .....	107
4.3 La deficiència del gen <i>Ndufs4</i> en neurones CCK no afecta la locomoció .....	108
4.4 Dèficits de socialització en els ratolins Cck:Ndufs4cKO .....	108
4.5 Els ratolins Cck:Ndufs4cKO no presenten alteracions sensorials.....	110
4.6 Alteracions en el patró respiratori dels ratolins Cck:Ndufs4cKO .....	114
4.7 Conseqüències fatals en anestesiar ratolins Cck:Ndufs4cKO.....	115
5. Neuroinflamació cortical severa en la disfunció del gen <i>Ndufs4</i> en neurones CCK.. .....	115
6. Reducció de les capes corticals superiors en ratolins Cck:Ndufs4cKO.....	121
7. Alteració en la distribució cortical de les neurones CCK deficientes en el gen <i>Ndufs4</i> .....	123
8. Estudi del perfil transcripcional cortical de neurones CCK en ratolins Cck:Ndufs4cKO .....	128
8.1 Validació de la tecnologia RiboTag per l'aïllament del traductoma en neurones CCK corticals amb deficiència mitocondrial .....	128
8.2 Augment en l'expressió de sensors d'estrès i gens activats per inflamació al còrtex de ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO .....	131
8.3 Gens relacionats amb la matriu extracel·lular i el citoesquelet presenten expressió alterada a nivell de neurones CCK en el context de la disfunció mitocondrial .....	134
8.4 Processos biològics comuns entre ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO i controls a nivell de neurones CCK en comparar dues àrees corticals.....	137
9. Caracterització del fenotip conductual en ratolins amb deficiència del gen <i>Ndufs4</i> en neurones PVALB.....	140
9.1 Caracterització dels trets fenotípics generals dels animals Pvalb:Ndufs4cKO .....	140
9.2 Els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO presenten alteracions severes de la coordinació motora i l'equilibri .....	141
9.3 La deficiència del gen <i>Ndufs4</i> en neurones PVALB causa hiperactivitat tardana .....	143

9.4	Comportament anòmal d'excavació i enterrament d'objectes en ratolins Pvalb:Ndufs4cKO .....	144
9.5	Caracterització del fenotip social en ratolins Pvalb:Ndufs4cKO .....	145
10.	Neuroinflamació en el cerebel degut a la deficiència del gen <i>Ndufs4</i> en neurones PVALB .....	147
	DISCUSSIÓ.....	151
1.	El còrtex cerebral com a àrea secundària en la SL .....	153
2.	Les neurones CCK mostren major vulnerabilitat a la deficiència del gen <i>Ndufs4</i> en comparació a les neurones PVALB a nivell cortical .....	155
3.	La deficiència del gen <i>Ndufs4</i> en neurones CCK desencadena l'aparició d'una cicatriu glial en el còrtex.....	158
4.	L'estrès oxidatiu com a possible estímul nociu a nivell tissular i iniciació de la resposta neuroinflamatòria degut a la deficiència del gen <i>Ndufs4</i> en neurones CCK.....	162
5.	El còrtex parietal com a àrea primària lesionada en els ratolins Cck:Ndufs4cKO.....	165
6.	Reducció de les capes corticals superiors en ratolins Cck:Ndufs4cKO.....	169
7.	Expressió de marcadors glutamatèrgics en una fracció abundant de neurones CCK.....	171
8.	La deficiència del gen <i>Ndufs4</i> en neurones CCK provoca canvis en l'estructura del citoesquelet neuronal compatibles amb pèrdua sinàptica .....	173
9.	Una organització sinàptica diferencial entre neurones CCK del còrtex parietal i temporal pot ser clau en la vulnerabilitat mitocondrial .....	175
10.	Les lesions corticals contribueixen en gran part a les alteracions fisiològiques i conductuals detectades en els ratolins Cck:Ndufs4cKO .....	176
11.	La deficiència del gen <i>Ndufs4</i> en neurones PVALB provoca alteracions en el cerebel.....	183
12.	El cerebel contribueix en gran part a les alteracions conductuals detectades en els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO.....	185
13.	La disfunció mitocondrial en neurones CCK i PVALB amb posterioritat a la formació del còrtex i del cerebel dona lloc a un fenotip tardà .....	189
	CONCLUSIONS .....	191
	REFERÈNCIES .....	195



## Llistat d'abreviacions i sigles

·OH	Radical hidroxil
AAV	Virus adeno-associat
ADC	Coeficient de difusió aparent
ADP	Adenosina difosfat
ASL	Marcatge de l'espín arterial
ATP	Adenosina trifosfat
BO	Bulb olfactori
Calb1	Calbindina
Casp-8	Caspasa-8
Cck	Colecistocinina
CCK <sup>INT</sup>	Interneurones inhibidores CCK
CCK <sup>CxP</sup>	Neurones CCK del còrtex parietal
CCK <sup>CxT</sup>	Neurones CCK del còrtex temporal
CCS	Capes corticals superiors
Cg1	Còrtex cingulat
CI	Complex I, NADH deshidrogenasa
CII	Complex II, succinat deshidrogenasa
CIII	Complex III, citocrom c reductasa
CIV	Complex IV, citocrom c oxidasa
cKO	<i>Knock out</i> condicional
CMAP	Potencial d'acció muscular compost
CMT	Tàlem medial central
CNAP	Potencial d'acció nerviós compost
Cnp	<i>2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>
CO <sub>2</sub>	Diòxid de carboni
CP	Cèl·lules de Purkinje
Crh	Hormona alliberadora de corticotropina
CRISPR	Repeticions palindròmiques curtes agrupades i interseparades regularment
CSF	Líquid cefaloraquídi
Ctip2	COUP-TF-interacting protein 2 o Bcl11b
CV	Complex V, ATP sintetasa
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAR	Diferencialment associat a ribosoma (transcrit)
DE	Diferencialment expressat (transcrit)
DIO	<i>Double-floxed inverse open reading frame</i>



## Llistat d'abreviacions i sigles

DMT	Tàlem medial dorsal
DNA	Ácid desoxiribonucleic
DNAsa	Desoxiribonucleasa
DRP1	Proteïna relacionada amb dinamina 1
DTI	Imatges de tensor de difusió
ETC	Cadena transportadora d'electrons
Expt	Temps d'experiment
FADH <sub>2</sub>	Flavina adenina dinucleòtid
FC	<i>Fold change</i> o canvi relatiu
FLASH	Seqüència de gradient d'eco de tir ràpid amb angle baix
FOR	<i>Forward</i>
FOV	Camp de visió
FrA	Còrtex frontal
Gad1	<i>Glutamate decarboxylase 1</i>
Gad2	<i>Glutamate decarboxylase 2</i>
GFAP	Proteïna àcida fibril·lar glial
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peròxid d'hidrogen
HA	Hemaglutinina
Hprt	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>
Iba-1	Molècula ionitzada d'unió al calci 1
IP	RNAm immunoprecipitat
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
ITR	<i>Inverted terminal repeats</i>
JAX	<i>The Jackson Laboratory</i>
LoxP	Locus of X-over P1
LPS	Lipopolisacàrids
LV	Ventricles laterals
M1	Còrtex motor primari
M2	Còrtex motor secundari
MEP	Potencial motor evocat
MFN1	Mitofusin 1
MFN2	Mitofusin 2
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MMP	Malalties mitocondrials primàries
MMS	Malalties mitocondrials secundàries
mRNA	RNA missatger
mtDNA	Genoma mitocondrial
mt-rRNA	RNA ribosomal

mt-tRNA	RNA de transferència
MTX	Matriu mitocondrial
NA	Nombre d'acumulacions
NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtid
NCe	Nuclis del cerebel
nDNA	Genoma nuclear
NDS	<i>Normal Donkey Serum</i>
Ndufs4	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4</i>
NGS	Seqüenciació de nova generació
NP	Neurones de projecció excitatòries
Npy	Neuropèptid Y
NSC	Cèl·lules mare neuronals
NTC	<i>Non-template control</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superòxid
OMIM	Herència mendeliana humana online
OPA1	Atròfia òptica 1
OXPPOS	Fosforilació oxidativa
PAC	Còrtex associatiu parietal
Pcp4	<i>Purkinje Cell Protein 4</i>
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDHc	Complex piruvat deshidrogenasa
PL	Músculs interosis plantars
Pvalb	Parvalbúmina
PVALB <sup>INT</sup>	Interneurones inhibidores PVALB
qPCR	PCR quantitativa
qRT-PCR	PCR quantitativa amb transcripció inversa o retrotranscripció
RARE	Seqüència d'adquisició ràpida per increment de la relaxació
rCBF	Flux sanguini cerebral relatiu
REV	<i>Reverse</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RM	Ressonància magnètica
RNA	Àcid ribonucleic
RNAse	Ribonucleasa
RNA-Seq	Seqüenciació massiva del transcriptoma
ROI	Regió d'interès
ROS	Espècies reactives d'oxigen
Rpl22	<i>Ribosomal protein L22</i>
rRNA	RNA ribosomal
S1HL	Còrtex somatosensorial primari de les extremitats posteriors
SEM	Error estàndard

## Llistat d'abreviacions i sigles

SL	Síndrome de Leigh
Slc17a6	<i>Solute carrier family 17 member 6 (Vesicular glutamate transporter 2)</i>
Slc17a7	<i>Solute carrier family 17 member 7 (Vesicular glutamate transporter 1)</i>
SNAP	Potencial d'acció nerviós sensorial compost
SNC	Sistema nerviós central
T2w	T2 ponderada
T2*w	T2 estrella ponderada
TA	Músculs tibials anteriors
TALENs	Nucleasa amb activitat similar a activador de transcripció
TCA	Cicle dels àcids tricarboxílics
TE <sub>eff</sub>	Temps efectiu d'eco
TR	Temps de repetició
tRNA	RNA de transferència
VDAC	Canal iònic depenent de voltatge
Vip	Pèptid vasoactiu intestinal
$\alpha$	Anti
$\Delta$	Deleció

# Resum

---



## Resum

Els mitocondris són la font principal d'energia en la majoria de les cèl·lules eucariotes, alhora que controlen altres processos incloent senyalització i mort cel·lular. La disfunció mitocondrial està vinculada a un gran nombre de patologies, principalment amb implicació del sistema nerviós central degut als alts requeriments energètics. En aquest sentit, la síndrome de Leigh (SL) és la malaltia mitocondrial pediàtrica més comú cursant amb una mort prematura. Tot i que els signes clínics associats a la SL són molt heterogenis, els pacients es caracteritzen per presentar lesions bilaterals i simètriques en el tronc de l'encèfal i/o ganglis basals. No obstant, al voltant del 18-25% dels pacients amb SL també manifesten alteracions en el còrtex cerebral, si bé no s'ha tingut en compte en la majoria dels estudis. Considerant la necessitat de determinar el paper del còrtex cerebral en l'evolució de la patologia, aquesta tesi doctoral està centrada en l'estudi *in vivo* de la disfunció mitocondrial en dues poblacions neuronals predominants en el còrtex [colecistocinina (CCK) i parvalbúmina (PVALB)]. Per una banda, la disfunció mitocondrial en neurones CCK va induir la presència de lesions corticals delimitades per una cicatriu glial i neuroinflamació aparent, juntament amb alteracions estructurals corticals i un fenotip motor sever que es relacionen amb alguns dels símptomes presentats per pacients amb SL. Per altra banda, la disfunció mitocondrial específica en neurones PVALB, les quals presenten un patró de resposta ràpid i gran dependència en l'energia mitocondrial, no va desenvolupar afectacions corticals histològicament aparents. En aquest cas, el fenotip motor i social observat es podia associar a la neuroinflamació detectada en el cerebel. En conclusió, aquest estudi determina la implicació del còrtex cerebral en el desenvolupament de la patologia de la SL alhora que identifica que la susceptibilitat cortical a la disfunció mitocondrial és específica de tipus neuronal.



## Summary

Mitochondria are the main energy source in most eukaryotic cells, while they also control many other processes from signaling to cell death. Mitochondrial dysfunction triggers different pathologies, mostly involving the central nervous system due to its high energy requirements. Leigh syndrome (LS) is the most common pediatric mitochondrial disease, linked to a premature death. Although the clinical signs present in LS patients are highly heterogeneous, they are characterized by bilateral and symmetrical lesions in the brainstem and/or basal ganglia. However, around 18-25% of patients with LS also show alterations in the cerebral cortex, which have been mostly neglected. To determine the role of the cerebral cortex in the progression of the pathology, this doctoral thesis is focused on the *in vivo* study of mitochondrial dysfunction in two neuronal populations predominant in the cerebral cortex [cholecystokinin (CCK) and parvalbumin (PVALB)]. Mitochondrial dysfunction in CCK neurons led to cortical lesions accompanied by glial scar formation and apparent neuroinflammation, together with structural alterations of the cortex and a severe motor phenotype, related with part of the phenotype presented by LS patients. On the other hand, cell-type specific mitochondrial dysfunction in PVALB neurons, which are characterized for their fast firing and high energetic requirements, did not lead to significant cortical involvement. In this case, the motor and social phenotype observed is likely to be associated with the neuroinflammation detected in the cerebellum. Overall, this study demonstrates the involvement of the cerebral cortex in the development of LS pathology while identifying that cortical susceptibility to mitochondrial dysfunction is neuron type-specific.





# Introducció

---



## 1. El mitocondri

### 1.1. Origen del mitocondri

Els mitocondris es van originar com a resultat de l'endosimbiosi entre un  $\alpha$ -proteobacteri i el precursor de la cèl·lula eucariota actual fa milions d'anys (Sagan 1967; Lane and Martin 2010). Tot i haver conservat trets bacterians ancestrals com un genoma circular i una doble membrana, durant aquest procés evolutiu el mitocondri ha adquirit noves funcions dins la cèl·lula eucariota (Lane and Martin 2010; Nunnari and Suomalainen 2012), destacant la de ser el centre de la producció energètica. Com a conseqüència de milions d'anys d'evolució, la major part del material genòmic de l' $\alpha$ -proteobacteri ancestral ha estat eliminat degut a la redundància de funcions o bé transferit al genoma nuclear de la cèl·lula hoste (Vafai and Mootha 2012; Friedman and Nunnari 2014).

El genoma mitocondrial (mtDNA) és una molècula circular d'unes 16,3 kb, del qual se'n troben diverses còpies en el mitocondri i codifica 13 subunitats integrants de la cadena transportadora d'electrons (Pearce et al. 2017; Bibb et al. 1981). D'altra banda, el mtDNA també codifica 2 RNA ribosomals (mt-rRNA) i 22 RNA de transferència (mt-tRNA) necessaris per la transcripció i traducció mitocondrials. Tot i així, els estudis més recents estimen que entre 1.136 i 1.140 proteïnes constitueixen els mitocondris en humans i ratolins, respectivament (Rath et al. 2021). Per tant, la gran majoria de proteïnes mitocondrials estan codificades en el genoma nuclear i són importades des del citosol al mitocondri (Nunnari and Suomalainen 2012; Quirós, Mottis, and Auwerx 2016).

Adicionalment, els mitocondris no només es comuniquen amb el nucli de manera bidireccional, sinó que també influeixen activament en d'altres components cel·lulars com els lisosomes, el reticle endoplasmàtic i diferents vies citosòliques per mitjà de ions, proteïnes i lípids (Mottis, Herzig, and Auwerx 2019).

### 1.2. Estructura i dinàmica mitocondrial

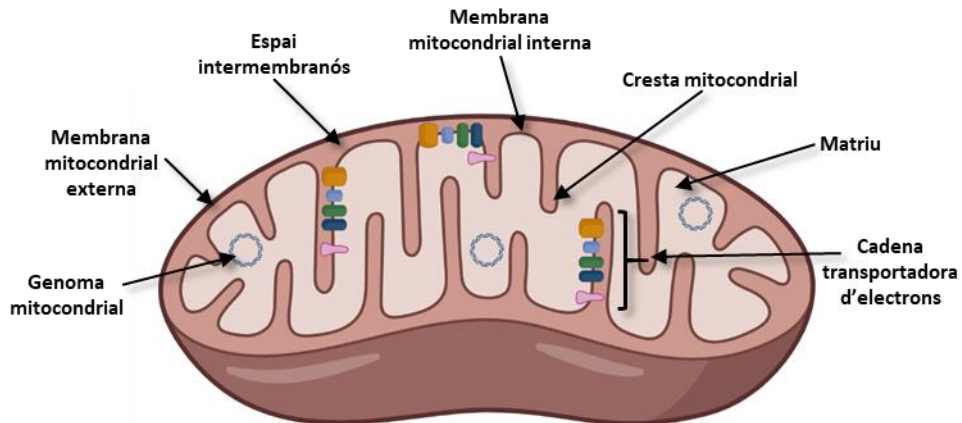
Els mitocondris són uns orgànuls cel·lulars formats per una doble membrana fosfolipídica constituïda per una membrana mitocondrial externa (MME) i una membrana mitocondrial interna (MMI). Aquesta estructura delimita dos espais amb característiques diferenciades. Per una banda, l'espai intermembranós i per l'altra la matriu mitocondrial, localitzada en el centre de la MMI (DiMauro and Schon 2003). Addicionalment, la MMI està organitzada en diferents plecs anomenats crestes mitocondrials, les quals permeten augmentar la superfície de la membrana i la capacitat energètica mitocondrial (Figura 1).

La MME té una composició de fosfolípids i proteïnes semblant a la membrana plasmàtica eucariota. Aquesta presenta permeabilitat a metabòlits d'uns 5 kDa cap a l'espai intermembranós gràcies als canals iònics dependents de voltatge (VDAC) (Kroemer, Galluzzi, and Brenner 2007). Contràriament, la MMI és pràcticament impermeable per la majoria de molècules – incloent els ions-, el que permet la regulació de l'entrada de metabòlits a la matriu mitocondrial mitjançant canals i proteïnes de transport (Kroemer, Galluzzi, and Brenner 2007; Abate et al. 2020). Aquest gran control en les membranes mitocondrials permet establir el potencial de membrana necessari per generar energia (Zorova et al. 2018).

Així mateix, els diferents components del mitocondri presenten una ubicació característica. Mentre que els complexes de la cadena transportadora d'electrons i l'ATP sintasa es localitzen en la MMI, el mtDNA i la majoria dels enzims relacionats amb el metabolisme de carbohidrats i lípids estan ubicats en la matriu mitocondrial (Figura 1) (R. Guo et al. 2018; Mishra and Chan 2014).

El mitocondri és un orgànul que presenta una elevada capacitat per modificar la seva morfologia en resposta a canvis en les condicions cel·lulars, tals com la presència d'estímuls bioenergètics, la fase del cicle cel·lular o de diferenciació cel·lular. De fet, la paraula "mitocondri" va ser utilitzada per primera vegada per Carl Benda al 1898

i prové de les paraules gregues “*mitos*” (filaments) i “*chondros*” (orgànuls), en referència a la morfologia canviant que presenten (Belenguer et al. 2019). Aquests canvis de morfologia són el resultat de processos de fusió i fissió, conformant el que s’anomena dinàmica mitocondrial.



**Figura 1. Esquema de l'estructura mitocondrial i els principals components que presenta.** L'estructura del mitocondri està formada per la membrana mitocondrial externa, l'espai intermembranós, la membrana mitocondrial interna amb les crestes, i la matriu mitocondrial. La cadena transportadora d'electrons junt amb l'ATP sintasa estan ubicats en la membrana mitocondrial interna, mentre que el genoma mitocondrial es localitza en la matriu mitocondrial.

### 1.3. Fosforilació oxidativa

La funció principal del mitocondri és participar, de manera majoritària, en la producció d'energia cel·lular en forma d'adenosina trifosfat (ATP; de *adenosine triphosphate*) per mitjà de la fosforilació oxidativa (OXPHOS; de *oxidative phosphorylation*). Aquest procés es duu a terme principalment en la MMI a través dels complexos de la cadena de transport d'electrons (ETC; de *electron transport chain*) i l'ATP sintasa (Complex V, CV). L'ETC està formada per 4 complexos: complex I (NADH deshidrogenasa, CI), complex II (succinat deshidrogenasa, CII), complex III (citocrom c reductasa, CIII) i complex IV (citocrom c oxidasa, CIV) (Cogliati et al. 2018) (Figura 2). Per tal d'augmentar la seva eficiència, els complexos mitocondrials s'associen en supercomplexos (SC) amb una estequiometria determinada.

## Introducció

Concretament, el CI forma un supercomplex amb el CIII<sub>2</sub> i el CIV (SC CI+CIII<sub>2</sub>+CIV), conegut com a respirasoma, així com amb el CIII<sub>2</sub> sol (SC CI+CIII<sub>2</sub>). Per altra banda, el CIII<sub>2</sub> forma un supercomplex amb el CIV (SC CIII<sub>2</sub>+CIV) mentre que el CV forma dímers (CV<sub>2</sub>) (Letts and Sazanov 2017). Els complexos estan formats per subunitats codificades tant en el mtDNA com en el genoma nuclear (nDNA), amb excepció del CII, el qual està codificat exclusivament pel nDNA (Taula 1) (Alston et al. 2017).

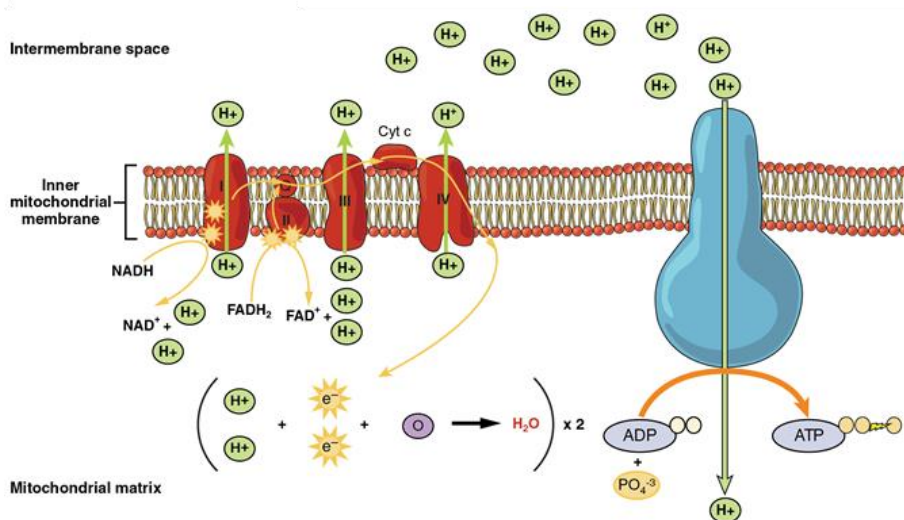
El cicle de Krebs o cicle dels àcids tricarboxílics (TCA; de *tricarboxylic acid cycle*), el qual té lloc en la matriu mitocondrial, oxida l'acetil-CoA fins a CO<sub>2</sub> generant molècules de NADH (nicotinamida adenina dinucleòtid) i FADH<sub>2</sub> (flavina adenina dinucleòtid), les quals actuen com a donadors d'electrons (Martínez-Reyes and Chandel 2020) a l'ETC en el CI i CII fins al CIV on l'oxigen és l'acceptador final d'electrons, formant aigua. Aquest procés és conegut com a respiració mitocondrial. La transferència d'electrons a través de l'ETC promou el bombeig de protons (H<sup>+</sup>) des de la matriu mitocondrial cap a l'espai intermembranós per part dels complexos I, III i IV, generant el gradient electroquímic de protons o potencial de membrana mitocondrial (Nolfi-Donagan, Braganza, and Shiva 2020). L'enzim ATP sintasa aprofita el gradient de protons per fosforilar l'ADP (adenosina difosfat) i produir ATP (Cogliati et al. 2018) (Figura 2).

**Taula 1. Llistat de subunitats estructurals dels diferents complexos de la fosforilació oxidativa codificats en el genoma mitocondrial (mtDNA) o bé en el genoma nuclear (nDNA) i els factors que participen en el seu assemblatge.** Informació adaptada de Alston et al., 2017.

	Complex I	Complex II	Complex III	Complex IV	Complex V
Subunitats estructurals mtDNA	MTND1, MTND2, MTND3, MTND4, MTND4L, MTND5, MTND6	-	MTCYB	MTCO1, MTCO2, MTCO3	MTAP6, MTAP8
Subunitats estructurals nDNA	NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFA1, NDUFA2, NDUFA3, NDUFA5,	SDHA, SDHB, SDHC, SDHD	UQCRB, UQCRC1, CYC1, UQCRC2, UQCRFS1, UQCRH,	COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C,	ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5D, ATP5E,

	<p>NDUFA6, NDUFA7,          NDUFA8, NDUFA9,          NDUFA10, NDUFA11,          NDUFA12, NDUFA13,          NDUFAB1, NDUFV1,          NDUFV2, NDUFV3,          NDUFB1, NDUFB2,          NDUFB3, NDUFB4,          NDUFB5, NDUFB6,          NDUFB7, NDUFB8,          NDUFB9, NDUFB10,          NDUFB11, NDUFC1,          NDUFC2</p>		<p>UQCRO,          UQCR10,          UQCR11</p>	<p>COX7A,          COX7B,          COX7C,          COX8</p>	<p>ATP5F1,          ATP5G1,          ATP5G2,          ATP5G3,          ATP5H,          ATP5I,          ATP5O,          ATP5J,          ATP5J2,          ATP5L,          ATP5L2</p>
<p><b>Factors          assemblatge          nDNA</b></p>	<p>NDUFAF1, NDUFAF2,          NDUFAF3, NDUFAF4,          NDUFAF5, NDUFAF6,          NDUFAF7, FOXRED1,          ACAD9, ECSIT,          NUBPL, TMEM126B,          TIMMDC1, C17orf89</p>	<p>SDHAF1,          SDHAF2,          SDHAF3,          SDHAF4</p>	<p>BCS1L,          LYRM7,          UQCC1,          UQCC2,          UQCC3,          TTC19,          PTC2</p>	<p>COA1, COA3,          COA4, COA5,          COA6, COA7,          COX10, COX11,          COX14, COX15,          COX16, COX17,          COX18, COX19,          COX20, SCO1,          SCO2, SURF1,          PET117, LRPPRC,          PET100, CEP89,          TACO1, OXA1L,          APOPT1,          NDUFA4,          FASTKD2</p>	<p>ATPAF1,          ATPAF2,          TMEM70</p>





**Figura 2. Esquema del flux d'electrons per la cadena transportadora d'electrons (ETC) associat al bombeig de protons cap a l'espai intermembranós per tal de generar energia en forma d'ATP en el mitocondri.** Les molècules NADH i FADH<sub>2</sub> actuen com a donadores d'electrons als complexos I i II, respectivament. Seguidament, els electrons són transferits als complexos III i IV, on l'oxigen actua com a acceptador final dels electrons formant aigua. El flux d'electrons a través de l'ETC promou el bombeig de H<sup>+</sup> per part dels complexos I, III i IV a l'espai intermembranós. Finalment, l'ATP sintasa aprofita el gradient de H<sup>+</sup> per generar ATP. Aquest procés és conegut com fosforilació oxidativa. Adaptat de Betts et al. 2021.

#### 1.4. Processos biològics amb participació mitocondrial

Adicionalment al paper principal dels mitocondris en la producció d'energia en forma d'ATP a través de la fosforilació oxidativa, diverses funcions cel·lulars bàsiques estan regulades i controlades per aquests orgànuls (Pearce et al. 2017), tals com la senyalització amb ions de Ca<sup>2+</sup>, l'apoptosi, l'autofàgia i l'estrès oxidatiu.

Els mitocondris produeixen radicals lliures, principalment espècies reactives d'oxigen (ROS; de *reactive oxygen species*), com a resultat de la gran accessibilitat a l'oxigen i de l'activitat de l'ETC. Les ROS, com el peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o radicals lliures tals com el radical superòxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) i el radical oxhidril (·OH), es generen com a subproductes de la respiració aeròbica i la fosforilació oxidativa. Així mateix, algunes

proteïnes de membrana i complexes poden generar ROS en menor mesura, incloent alguns enzims del TCA (Starkov 2004). Un desequilibri entre la producció oxidativa i la capacitat antioxidant de la pròpia cèl·lula desencadena en estrès oxidatiu (Rigoulet, Yoboue, and Devin 2011; Angelova and Abramov 2018). L'equilibri redox es manté en la matriu mitocondrial a través d'un sistema antioxidant molt controlat, per exemple amb l'enzim glutatió, el qual està distribuït tant en el mitocondri com en la cèl·lula per actuar com a donador d'electrons a les ROS reduint-les (Forman, Zhang, and Rinna 2009). L'estrès oxidatiu causa dany en les biomolècules cel·lulars (proteïnes, lípids i material genètic) i en els teixits, alterant la proliferació cel·lular, la transcripció gènica, el metabolisme i inclús iniciant la mort cel·lular (Abate et al. 2020). El dany oxidatiu en el material genètic provoca modificacions en la seqüència de nucleòtids i trencaments de la doble cadena, tots ells actuant com a potencials efectes mutagènics (Bohr 2002). Així mateix, la peroxidació lipídica als mitocondris està relacionada amb una inhibició del metabolisme mitocondrial, i l'alteració de les propietats de la MMI i del potencial de membrana (Ademowo et al. 2017). Per tant, cal un control precís de la funció mitocondrial per tal d'evitar els efectes nocius que causa l'estrès oxidatiu (Ott et al. 2007).

Un altre procés en el que participa el mitocondri és la senyalització del  $\text{Ca}^{2+}$  per mitjà de la captació i/o alliberació d'aquest missatger secundari intracel·lular en funció de les necessitats cel·lulars. Aquest procés pot ser beneficiós, mantenint la bioenergètica cel·lular, o bé tòxic, quan s'involucra en la mort cel·lular (Rossi, Pizzo, and Filadi 2019). Per últim, l'apoptosi o mort cel·lular programada és un mecanisme d'autodestrucció cel·lular on el mitocondri és el principal òrganul que la regula (Abate et al. 2020). Aquest s'encarrega d'activar la via intrínseca apoptòtica per mitjà de la proteòlisi de caspases i promovent la fragmentació cromosòmica, a la vegada que també participa en la via apoptòtica extrínseca, activada per receptors de mort cel·lulars de superfície (Jeong and Seol 2008).

### 1.5. Paper del mitocondri en el sistema nerviós central

S'estima que el cervell humà consumeix el 20% de l'oxigen i el 25% de la glucosa del cos tot i representa només el 2% de la massa corporal (Rolfe and Brown 1997), posant de manifest l'alt requeriment energètic del sistema nerviós central (SNC). La comunicació entre les neurones requereix el manteniment del gradient electroquímic, el potencial d'acció i l'alliberament i reciclatge de vesícules sinàptiques amb neurotransmissors, tots ells processos on és necessària una gran aportació energètica (Attwell and Laughlin 2001; Devine and Kittler 2018). A més a més, aquests processos també estan regulats per la senyalització amb  $Ca^{2+}$ , principalment en la zona pre-sinàptica. Els mitocondris són els orgànuls idonis per dur a terme aquestes funcions, ja que són una font energètica a través de la producció d'ATP i a més, actuen com a tamponadors de  $Ca^{2+}$  per mantenir-ne l'homeòstasi (Devine and Kittler 2018).

La neurogènesi és el procés pel qual es generen les neurones a partir de cèl·lules mare neuronals (NSC; de *neuronal stem cells*) durant el desenvolupament i en certes àrees cerebrals de l'adult. S'ha demostrat que en les NSC, la decisió de diferenciar-se a neurones i deixar d'autorenovar-se està influenciada per la dinàmica mitocondrial (Khacho, Harris, and Slack 2019; Iwata, Casimir, and Vanderhaeghen 2020). Per tant, un correcte funcionament dels mitocondris i la seva morfologia són imprescindibles en el desenvolupament del SNC.

La biogènesi del mitocondri té lloc al voltant del nucli per tal de facilitar l'acoblament entre les proteïnes codificades en el nDNA amb les codificades en el mtDNA (Davis and Clayton 1996). Posteriorment, els mitocondris són distribuïts intracel·lularment en funció de les necessitats fisiològiques cel·lulars. En el cas de les neurones, gràcies als microtúbuls i a diferents proteïnes motores, els mitocondris són reclutats activament des del soma a la zona pre-sinàptica (moviment anterògrad) o bé a la inversa (moviment retrògrad) (Yanmin Chen and Sheng 2013).

El reclutament dels mitocondris a les sinapsis està motivat per l'activitat neuronal, en aquelles sinapsis on es produeix l'alliberament de vesícules sinàptiques (Silva et al. 2021). La maduració de la sinapsi neuronal s'assoleix gràcies a la formació i eliminació de determinades connexions per tal d'assegurar un bon funcionament dels circuits neuronals. Diferents estudis apunten que els mitocondris estan involucrats en el desenvolupament de noves sinapsis, ja que aporten l'energia necessària per la síntesi de proteïnes i s'ha demostrat el seu reclutament actiu a les zones pre-sinàptiques naixents (Courchet et al. 2013; Silva et al. 2021). Paral·lelament, en el procés de *pruning* o eliminació de sinapsis, els mitocondris també hi tenen un paper clau. Mitjançant l'activació local de la caspasa 3 provoquen l'eliminació d'espines i dendrites no desitjades per regular la densitat sinàptica sense provocar apoptosi neuronal (Erturk, Wang, and Sheng 2014).

## 2. Malalties mitocondrials

El paper central que desenvolupen els mitocondris en el metabolisme cel·lular a través de la fosforilació oxidativa i de la diversitat de processos que controlen fan que alteracions en la funció mitocondrial donin lloc a greus conseqüències tant a nivell cel·lular com de l'organisme. En aquest sentit, les malalties mitocondrials són un grup heterogeni de trastorns caracteritzats per una disfunció en la fosforilació oxidativa i per tant, en la capacitat cel·lular d'obtenir energia (Craven et al. 2017). En funció de la seva etiologia, es classifiquen en malalties mitocondrials primàries (MMP) o secundàries (MMS) (Falk 2010; Niyazov, Kahler, and Frye 2016). Les MMP es donen degut a mutacions en el nDNA o bé en el mtDNA de gens que codifiquen subunitats de la cadena respiratòria o de proteïnes d'acoblament dels complexos mitocondrials. Actualment, s'han descrit més de 350 gens amb mutacions patogèniques causants de MMP (McCormick, Zolkipli-Cunningham, and Falk 2018; J. Rahman and Rahman 2018). Per altra banda, les MMS fan referència a aquelles patologies amb funcions mitocondrials alterades que no estan relacionades de

## Introducció

manera directa amb subunitats de la OXPHOS o la seva formació (Niyazov, Kahler, and Frye 2016). Les malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer o el Parkinson solen desencadenar en MMS ja que presenten alteracions en la funció mitocondrial, tals com una reducció en la producció d'ATP o canvis en la dinàmica mitocondrial de fusió-fissió (Archer 2013).

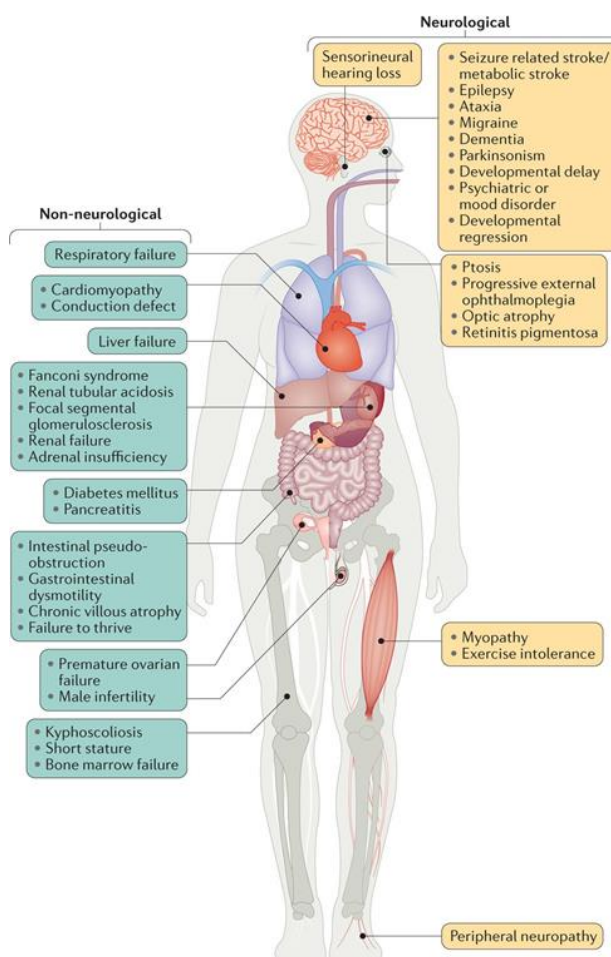
La prevalença de mutacions patogèniques és de 23 casos per 100.000 individus adults, tenint en compte mutacions en el nDNA, mtDNA i tots aquells individus amb risc de patir malalties mitocondrials (Gorman et al. 2015). En canvi, la prevalença de les malalties mitocondrials en infants menors de 16 anys és entre 5-15 casos per 100.000 individus, en funció de la població analitzada i la seva consanguinitat (Darin et al. 2001; Skladal, Halliday, and Thorburn 2003; Gorman et al. 2016). L'aparició de la malaltia es pot donar en nounats, infants o inclús en l'etapa adulta (Gorman et al. 2016).

El patró d'herència de les MMP varia en funció del genoma portador de la mutació. En el cas de mutacions en el nDNA es segueix una herència autosòmica o lligada al cromosoma X, mentre que en el cas de mutacions en el mtDNA presenta herència materna (Alston et al. 2017) ja que aquest s'hereta pràcticament per via materna i el mtDNA patern és destruït de manera activa després de la fecundació en la majoria d'animals (Al Rawi et al. 2011). La distribució dels mitocondris en els diferents tipus cel·lulars i òrgans del cos és desigual i sembla ser aleatòria. A més a més, en el cas de patologia, en una mateixa cèl·lula també hi pot haver mitocondris amb mutacions en el seu genoma i mitocondris sense afectacions, fenomen conegut com a heteroplasmia (Nissanka and Moraes 2020).

Clínicament, les MMP són molt heterogènies degut als diferents patrons d'herència i a la presència dels mitocondris en totes les cèl·lules nucleades, per tant afectant potencialment tots els òrgans. No obstant aquesta implicació multisistèmica, aquells òrgans amb una demanda energètica més elevada i mitocondrialment dependents exhibeixen més afectacions, incloent el SNC, el múscul esquelètic i el múscul cardíac.

Els signes clínics presentats per pacients amb malalties mitocondrials inclouen condicions tant variables com epilèpsia, atàxia, cardiomiopatia, diabetis mellitus, problemes gastrointestinals o atròfia òptica (Figura 3) (Gorman et al. 2016).

Actualment el diagnòstic de les malalties mitocondrials es basa en un estudi genètic, així com anàlisis histoquímics i bioquímics a partir de biòpsies de teixit. Les correlacions genotip-fenotip solen ser complicades d'establir de manera directa. Un mateix síndrome pot estar causat per mutacions en diferents gens i mutacions en un gen poden estar relacionades amb diferents síndromes en funció dels teixits afectats en el cas d'existir heteroplasmia (Craven et al. 2017).



**Figura 3. Signes clínics presentats en les malalties mitocondrials.** Generalment es dona una afectació multisistèmica de diferents òrgans, sobretot en aquells amb gran demanda energètica. Els signes clínics estan classificats en neurològics o no-neurològics. Adaptat de Gorman et al. 2016.

### **3. La síndrome de Leigh**

La síndrome de Leigh (SL) (OMIM, #25600) és una malaltia neurodegenerativa severa i progressiva també coneguda com a encefalopatia necrotitzant subaguda. És la presentació pediàtrica de malaltia mitocondrial primària més comú, causant una mort prematura. Els pacients afectats per la SL manifesten una gran variabilitat de signes clínics, majoritàriament neurològics. Una de les característiques principals és la presència de lesions bilaterals, simètriques i necrotitzants en els ganglis basals, diencèfal, cerebel o tronc de l'encèfal, causant retràs en el desenvolupament, atàxia, hipotonia o epilèpsia (Schubert Baldo and Vilarinho 2020). La SL es caracteritza per una deficiència en la generació d'energia deguda a mutacions en gens que codifiquen per subunitats de la fosforilació oxidativa i factors associats a la seva formació, enzims relacionats amb la biosíntesi de la ubiquinona i del complex piruvat deshidrogenasa (Lake et al. 2015).

#### **3.1. Història, prevalença i prognosis de la SL**

La SL va ser descrita per primera vegada pel neuropsiquiatra britànic Denis Leigh al 1951 en detallar el cas d'un nadó amb un patró neuropatològic únic fins al moment (Leigh 1951). Tot i la diversitat en la clínica presentada pels pacients amb SL, el patró neuropatològic és consistent en la majoria d'ells. Històricament, el diagnòstic de la malaltia es realitzava *post mortem* una vegada s'efectuava la necròpsia del SNC. L'aplicació posterior de les tècniques de ressonància magnètica (RM) va facilitar l'estudi de la progressió de la malaltia així com el seu diagnòstic (Baertling et al. 2014; Lake et al. 2015).

Des dels seus inicis, es va considerar la SL com una malaltia metabòlica degut als alts nivells de lactat i piruvat en sang i a les evidències bioquímiques en la disfunció del complex piruvat deshidrogenasa (PDHc), CI o CIV de la OXPHOS (Worsley et al. 1965; Willems et al. 1977; Ohtake et al. 1982). A més a més, també es detectaven

alteracions en la morfologia mitocondrial en biòpsies de múscul esquelètic de pacients amb SL (Willems et al. 1977). Totes aquestes troballes van permetre deduir que la SL estava causada per una deficiència en el metabolisme energètic mitocondrial i descriure-la com a encefalopatia mitocondrial (Lake et al. 2016).

La prevalença de la SL o síndrome similar a Leigh és de 1 de cada 40.000 naixements vius (S. Rahman et al. 1996), tot i així aquest valor pot variar significativament en funció de la població analitzada i si es dona un efecte fundador (van Erven et al. 1987; Ostergaard et al. 2007). Generalment, el deteriorament clínic presentat pels pacients amb SL és tan ràpid que moren al cap de 2 anys de l'aparició dels primers símptomes (S. Rahman et al. 1996). En la majoria dels casos, la defunció es dona abans dels 5 anys d'edat però l'heterogeneïtat de la malaltia fa que el rang de l'edat variï des d'1 mes fins als 21 anys. Pel que fa a les causes de la defunció, en un estudi amb 130 pacients diagnosticats amb SL, el 51% van morir com a conseqüència de problemes respiratoris i un 17,3% per infeccions (Sofou et al. 2014).

### **3.2. Signes clínics de la SL**

Els signes i símptomes de la SL acostumen a aparèixer de mitjana als 7 mesos d'edat, i als 2 anys, el 80% dels pacients ja presenten signes clínics. Aquests solen fer-se més evidents com a conseqüència d'estressos metabòlics, tals com una infecció, anestèsics, cirurgies o un dejuni prolongat. En concret, els primers signes clínics poden implicar una regressió en el desenvolupament amb pèrdua de funcions prèviament adquirides (Baertling et al. 2014). Tot i que també s'ha observat l'aparició de la SL en l'edat adulta, és poc freqüent (Chalmers et al. 1997; Nagashima et al. 1999).

Tal com ja s'ha mencionat, al tractar-se d'una malaltia mitocondrial, els òrgans amb més demanda energètica són els més alterats en la SL, presentant els individus afectats una disfunció multisistèmica amb implicació de 3 òrgans com a mínim



## Introducció

(Sofou et al. 2014). Degut a les característiques funcionals del SNC, les alteracions neuronals són les més severes i freqüents, amb presentacions tals com atàxia, epilèpsia, demència, microcefàlia, atròfia de la retina, sordesa o problemes cognitius. Tot i així, no es poden menystenir tot el seguit de signes clínics no neurològics associats a la SL: cardiomiopatia, hipotonia muscular, bradicàrdia, problemes en el desenvolupament, afectacions renals o unes característiques facials determinades. Altres símptomes inclouen dificultats per menjar o problemes respiratoris (Taula 2) (Finsterer 2008; Baertling et al. 2014). La prevalença de cada signe clínic és molt variable entre els pacients. D'aquesta manera, mentre que les alteracions motores estan presents en tots ells, altres afectacions com els problemes hepàtics o renals són poc freqüents (Taula 2) (Sofou et al. 2014). La presència de simptomatologia abans dels 6 mesos i un historial clínic amb epilèpsia són els dos factors amb associació significativa amb una reducció en la supervivència i amb major probabilitat de recaigudes i hospitalitzacions pels pacients amb SL (Sofou et al. 2014).

**Taula 2. Prevalença dels signes clínics manifestats en pacients del síndrome de Leigh.** Dades obtingudes en analitzar una cohort de 130 pacients diagnosticats de diferents països europeus. Informació adaptada de Sofou et al., 2014.

<b>Alteracions generals presentades</b>	<b>Alteracions concretes</b>	<b>Prevalença (%)</b>
Alteracions motores	Hipotonia (74,6%), afectació en el reflex del tendó (47,7%), distonia (44,6%), reflex de Babinski (42,3%), espasticitat (36,2%), atàxia (34,6%), hipertonia (33,1%) i debilitat muscular (26,2%)	99,2
Alteracions oculars	Nistagme (23,8%), estrabisme (19,2%), discapacitat visual (16,2%) i atròfia òptica (14,6%)	60,8
Dificultats per menjar		45,4
Epilèpsia	Generalitzada (22,3%), focal (14,6%) i espasmes epilèptics (6,1%)	39,2
Disfunció respiratòria	Hiperventilació i/o patró respiratori alterat (20%), apnea (16,1%), malaltia respiratòria restrictiva (13,8%) i hipoventilació central (10%)	37,7

Discapacitat intel·lectual		36,9
Dificultats per ingerir líquids		24,6
Disfunció auditiva		19,2
Disfunció cardíaca	Cardiomiopatia hipertròfica (9,2%)	17,7
Alteracions en el desenvolupament		16,2
Disfunció hepàtica		12,3
Microcefàlia		11,5
Neuropatologia perifèrica		6,9
Disfunció renal		5,4
Disfunció hematològica		1,5

### 3.3. Etiologia i manifestacions genètiques de la SL

Actualment, segueix sent un repte determinar les causes genètiques d'algunes manifestacions de la SL. En l'estudi anteriorment mencionat de Sofou et al. 2014, només el 60% dels pacients amb SL comptava amb una etiologia gènica associada. Aquest fet és degut a la gran heterogeneïtat de signes clínics, deficiències bioquímiques i al gran nombre de gens implicats codificats tant en el genoma mitocondrial com nuclear. Tal com s'ha descrit prèviament en referència a les MMP, el patró d'herència de la SL pot ser per transmissió materna com a causa de mutacions en el mtDNA, herència autosòmica per mutacions en el nDNA o bé herència lligada al cromosoma X, com en el cas de mutacions en el gen piruvat deshidrogenasa subunitat  $\alpha 1$  (PDHA1) (Sofou et al. 2014; Lake et al. 2016). Cal remarcar que en molts casos hi ha una dificultat per establir una correlació entre genotip i fenotip (Fassone and Rahman 2012).

Tal i com s'indica en la Taula 3, actualment s'han detectat un centenar de gens amb mutacions patogèniques causants de SL (Lake et al. 2016; Schubert Baldo and Vilarinho 2020), molts dels quals codifiquen per subunitats estructurals dels complexos de la ETC o bé per proteïnes que ajuden al seu assemblatge, estabilitat i

## Introducció

activitat. En l'última dècada, a través de l'avenç tecnològic en la seqüenciació de nova generació (NGS), s'han pogut identificar nous gens i noves mutacions patogèniques relacionades amb la SL (Baertling et al. 2014; Lake et al. 2016; Souza et al. 2019).

**Taula 3. Llistat de gens causants de síndrome de Leigh o síndrome similar a Leigh quan presenten mutacions.** Informació adaptada de Lake et al., 2016; Schubert Baldo & Vilarinho, 2020.

Deficiència bioquímica	Gens
Complex I	MTND1, MTND2, MTND3, MTND4, MTND5, MTND6, NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS7, NDUFS8, NDUFA1, NDUFA2, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA12, NDUFAF2, NDUFAF5, NDUFAF6, FOXRED1, NDUFB8, NDUFAF4, NUBPL
Complex II	SDHA, SDHAF1
Complex III	UQCRCQ, BCS1L, TTC19
Complex IV	MTCO3, NDUFA4, SURF1, COX8A, COX10, COX15, SCO2, PET100, LRPPRC, TACO1, ETHE1
Complex V	MTATP6
Coenzim Q <sub>10</sub>	PDSS2, COQ9
PDHc	PDHA1, PDHB, PDHX, DLAT, DLD, LIPT1, LIAS, TPK1, SLC19A3, SLC25A19
Manteniment mtDNA	FBXL4, POLG, POLG2, SUCLA2, SUCLG1
Traducció mitocondrial	$\Delta$ mtDNA, MTTI, MTTK, M TTL1, MTTV, MTTW, MTFMT, GTPBP3, TRMU, EARS2, FARS2, IARS2, NARS2, GFM1, GFM2, TSFM, C12orf65, PNPT1
Dinàmica mitocondrial	SLC25A46, DNM1L, MFN2, RRM2B
Fosforilació oxidativa i/o PDH	HIBCH, ECHS1, SERAC1, AIFM1
Altres funcions mitocondrials afectades	BOLA3, TWNK, SLC25A4, MPV17, MRPS34, MRPS39, CLPB, SPG7, ADAR, RNASEH1, RANBP2, NUP62, SLC39A8, BTD

PDHc= Complex piruvat deshidrogenasa

Tot i que s'han descrit mutacions en gens dels 5 complexos de l'ETC, les deficiències en els CI i CIV són les més freqüents en la SL. D'altra banda, la SL és la presentació més habitual en la deficiència del CI (Fassone and Rahman 2012; Lake et al. 2016). Entre els pacients amb deficiència del CI autosòmica recessiva associada a SL, la mutació en la subunitat NDUFS4 (NADH deshidrogenasa Fe-sulfur proteïna 4) és la

més comú, amb més de 20 casos descrits (Fassone and Rahman 2012). Altrament, les mutacions en el gen *NDUFS4* mostren una bona correlació genotip-fenotip, causant SL en tots els casos en comparació amb la diversitat de diagnòstics exhibits en mutacions d'altres subunitats del CI (Lake et al. 2016).

Per altra banda, el 15% dels casos de SL presenten deficiència del CIV, sent el gen *SURF1* el més afectat habitualment, amb >200 casos descrits (Wedatilake et al. 2013; Lake et al. 2016). En aquest cas, els pacients amb deficiències en *SURF1* mostren homogeneïtat bioquímica i simptomatològica (Wedatilake et al. 2013). Per últim, les deficiències en els CII, CIII i el coenzim Q<sub>10</sub> són molt poc freqüents, representant menys del 10% dels casos amb SL (Lake et al. 2016; Schubert Baldo and Vilarinho 2020).

### **3.4. Diagnòstic neuropatològic de la SL**

#### **3.4.1. Ressonància magnètica**

Les imatges de RM aporten informació crucial de l'anatomia cerebral per l'estudi de les malalties mitocondrials. Es basen en aplicar un camp magnètic potent i uniforme al voltant dels teixits, el qual provoca una reorientació dels nuclis d'hidrogen de les molècules d'aigua que absorbeixen i alliberen ones electromagnètiques a una freqüència característica o ressonant. Les ones electromagnètiques són detectades, quantificades i representades en imatges mitjançant un processament informàtic (Yousaf, Dervenoulas, and Politis 2018). Les neuroimatges es generen principalment a partir de l'aigua i el greix corporal. A la vegada, l'alta concentració d'àtoms d'hidrogen en els teixits biològics així com la gran sensibilitat que presenten en un camp magnètic, fan que els anàlisis de RM es basin principalment en aquest àtom.

Un tipus de RM són les imatges de contrast o relaxometria, les quals es basen en registrar el temps de relaxació longitudinal (T1) i transversal (T2) del camp magnètic exercit (Does 2018). Els fluids biològics, com la sang i el líquid cefalorraquidi,

## Introducció

tendeixen a tenir temps llargs de relaxació T1 i T2, ja que les molècules d'aigua tenen llibertat de moviments. Per contra, els teixits sòlids, com la substància gris i blanca, acostumen a tenir temps curts de relaxació degut a la interacció de les molècules d'aigua amb macromolècules (Yousaf, Dervenoulas, and Politis 2018). Aquestes característiques fan que els ventricles cerebrals es visualitzin amb una senyal més brillant que la substància blanca. En patologia, les zones cerebrals alterades per inflamació o tumors tendeixen a tenir valors més llargs de T2 i ser més brillants, assimilant-se així al comportament de l'aigua lliure.

Paral·lelament, el paràmetre de difusió fa referència al moviment arbitrari de les molècules d'aigua en un cos. Aquesta variable és analitzada en RM mitjançant les imatges de tensor de difusió (DTI), les quals permeten quantificar el grau d'anisotropia i l'orientació estructural de la mostra (Yousaf, Dervenoulas, and Politis 2018). La difusió en la substància blanca cerebral està restringida a una sola direcció o anisotropia a través de l'axó, mentre que la substància gris és menys anisotròpica i el líquid cefalorraquidi presenta difusió en totes direccions sent isotròpic. D'aquesta manera és possible distingir l'anatomia cerebral en imatges de difusió. En un teixit sa, la difusió de l'aigua està limitada per les estructures cel·lulars. Un augment en la difusió està associat a la disrupció de les membranes cel·lulars i permet identificar lesions i canvis degeneratius (Helenius et al. 2002; Yousaf, Dervenoulas, and Politis 2018).

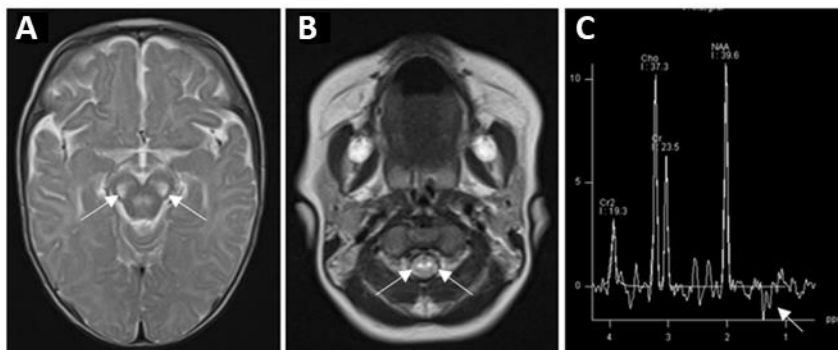
### **3.4.2. Manifestacions neuropatològiques en la SL**

Al contrari del que succeeix amb l'heterogeneïtat dels signes clínics, la SL presenta patrons neuropatològics molt concrets i característics. Consisteixen en lesions simètriques i bilaterals localitzades principalment en els ganglis basals i/o tronc de l'encèfal (Sofou et al. 2014; Lake et al. 2015; Bricout et al. 2014). El 60% dels pacients amb SL presenten alteracions en una d'aquestes àrees cerebrals o bé en les dues, mentre que el 40% restant mostra afectacions en d'altres àrees (Fassone and

Rahman 2012). L'anàlisi microscòpic de les lesions revela degeneració espongiforme, proliferació capil·lar, pèrdua de mielina i gliosis en la zona amb preservació relativa de les neurones (Loeffen et al. 1998; Finsterer 2008).

Les altres àrees cerebrals amb afectació en la SL inclouen tàlem, cerebel i medul·la espinal i en concret estructures tals com substància negra, putamen i nucli dentat del cerebel (Cavanagh and Harding 1994; Lake et al. 2015). El còrtex cerebral també pot presentar afectacions, sobretot en aquells pacients amb mutacions en gens *NDUF*, relacionats amb el CI (Sofou et al. 2018). A més a més, alguns malalts també mostren una dilatació dels ventricles laterals (Horváth et al. 2006; Ostergaard et al. 2007). Mitjançant RM, s'observa com aquestes àrees afectades mostren una senyal hiperintensa en els anàlisis de T2 ponderada i una senyal hipointensa en T1 ponderada (Figura 4A, B). Addicionalment, anàlisis de ressonància magnètica espectroscòpia permeten detectar pics de lactat en els ganglis basals i tronc encefàlic en la SL (Figura 4C) (Bekiesinska-Figatowska, Mierzewska, and Jurkiewicz 2013; Baertling et al. 2016). Les lesions detectades per neuroimatges poden variar en el moment en que s'inicien els símptomes, però encara poden evolucionar més després d'una crisi metabòlica com una infecció (Baertling et al. 2016).

El patró de lesions en els ganglis basals i el tronc de l'encèfal tan característic en la majoria de pacients amb SL, fa que les imatges de RM no contribueixin a elucidar la causa genètica de l'afectació i s'hagin de cursar en paral·lel amb la seqüenciació dels possibles gens involucrats o amb anàlisis bioquímics de l'activitat dels complexos mitocondrials (Fassone and Rahman 2012; Baertling et al. 2016).



**Figura 4.** Imatges de ressonància magnètica mostrant alteracions cerebrals d'un pacient de 4 mesos d'edat amb SL portador d'una mutació en el gen *Ndufs4*. **A, B)** Imatges axials de T2 ponderada amb lesions bilaterals en el peduncle cerebral (A) i tronc de l'encèfal (B), indicat amb fletxes. **C)** Pic de lactat en la ressonància magnètica espectroscòpica, indicat amb fletxa. Adaptat de Baertling et al. 2016.

### 3.5. Diagnòstic genètic i bioquímic de la SL

En base a la gran heterogeneïtat simptomatològica, s'han establert uns criteris clínics per tal de diagnosticar correctament la SL: (1) neurodegeneració progressiva amb lesions bilaterals i simètriques en els ganglis basals i/o talem i/o tronc de l'encèfal, (2) retràs en el desenvolupament motor i intel·lectual i (3) metabolisme energètic afectat. Aquest últim criteri pot incloure defectes severes en la fosforilació oxidativa o en l'activitat de la piruvat deshidrogenasa, la detecció d'una mutació en un gen relacionat amb la generació d'energia mitocondrial o bé nivells elevats de lactat en sang o en líquid cefalorraquidi (S. Rahman et al. 1996; Sofou et al. 2014; Lake et al. 2016). Tots aquells pacients que no presenten aquestes característiques clíniques de manera exacta, se'ls diagnostica com a afectats pel síndrome similar a Leigh. Generalment, aquests pacients mostren una simptomatologia heterogènia amb afectacions neurològiques que recorden a les de la SL però que no afecten a les mateixes àrees cerebrals (Zhang et al. 2007; Finsterer 2008; Baertling et al. 2014).

Avui en dia, els avenços i una major accessibilitat a la tecnologia genètica han propiciat el diagnòstic genètic de la SL, pel qual cal aplicar certs criteris per tal d'abordar la mutació patològica. Generalment, es comença seqüenciant el mtDNA,

especialment en aquells pacients amb aparició de símptomes de manera primerenca (Baertling et al. 2014). En el supòsit que es descartin les mutacions en el mtDNA, el següent pas consisteix en seleccionar gens nuclears candidats per l'anàlisi de seqüenciació. En els defectes del nDNA és molt important que es reconeguin determinats símptomes o patrons per tal de reduir el nombre de gens candidats i obtenir el diagnòstic genètic amb la màxima celeritat (Schubert Baldo and Vilarinho 2020). En el cas d'un fenotip no concloent, és necessària una aproximació genètica de NGS, la qual pot incloure un panell de gens, seqüenciació de l'exoma clínic o seqüenciació de tot el genoma. Aquestes noves eines diagnòstiques tenen una gran rellevància principalment en aquells pacients que només comptaven amb un diagnòstic clínic, basat en neuroimatges i característiques bioquímiques. Actualment, la ràpida evolució de la tecnologia de NGS permet analitzar gens patogènics coneguts i buscar variants patogèniques en nous gens candidats (Nogueira et al. 2019).

Malgrat la notable millora en el diagnòstic genètic, en aquells casos on aquesta aproximació no és concloent cal realitzar un anàlisi de biòpsia de múscul o pell del pacient (Janssen, Smeitink, and van den Heuvel 2003; Baertling et al. 2014). Degut a la demanda energètica del múscul, aquest teixit sol estar afectat en les malalties mitocondrials. El seu anàlisi aporta informació de l'estat del sistema energètic mitocondrial i els seus components. Per altra banda, la biòpsia de pell és una bona alternativa pels infants ja que és menys invasiva, però en casos d'heteroplàsmia, es poden obtenir resultats normals o només parcialment alterats en els fibroblasts (Schubert Baldo and Vilarinho 2020).

Complementàriament, també es realitza un diagnòstic bioquímic ja que el 75% dels pacients de la SL presenten nivells alts de lactat en sang, orina i/o líquid cefalorraquidi (Janssen, Smeitink, and van den Heuvel 2003; Sofou et al. 2014) degut a canvis en la relació NADH/NAD<sup>+</sup> en el mitocondri, el que desencadena un augment en els nivells de piruvat i posteriorment aquest és transformat en lactat. A part del



lactat, altres metabòlits com els aminoàcids o àcids orgànics (intermediaris del TCA) poden estar alterats en sang i orina (Baertling et al. 2014).

### **3.6. Mecanismes cel·lular involucrats en la progressió de la SL**

L'extensiva caracterització de la neuropatologia i els signes clínics presents en els pacients amb SL contrasta amb el poc coneixement de les causes moleculars que desencadenen les lesions neuronals.

Les evidències genètiques apunten als defectes en la producció energètica mitocondrial com a principal causa de la SL. Tot i així, alteracions en la generació d'energia mitocondrial poden desencadenar en diferents presentacions neuropatològiques i clíniques que descriuen diverses encefalopaties mitocondrials (Koopman et al. 2012). El grau d'afectació energètica pot ser el factor clau en determinar la manifestació clínica. Alguns estudis apunten que la SL seria la representació més severa de la patologia mitocondrial (Lake et al. 2015). En aquest sentit, s'ha descrit que nivells baixos d'heteroplasmia de mutacions al gen mitocondrial MTATP6 provoquen símptomes lleus en els pacients, mentre que nivells alts d'heteroplasmia desencadenen en l'entitat clínica de la SL més severa (White et al. 1999). Aquest fet posa en relleu que la SL està associada a una manifestació més severa d'estrès mitocondrial i deficiència d'ATP, en comparació a d'altres encefalopaties mitocondrials. Tal com evidencien estudis realitzats en neurones i astròcits de ratolins model amb deficiència constitutiva de la subunitat mitocondrial NDUFS4 del CI (*Ndufs4<sup>fky/fky</sup>*), on es descriu una reducció en la generació d'ATP en aquests tipus cel·lulars (M. J. Bird et al. 2014).

Juntament amb la disminució en la capacitat energètica cel·lular, l'estrès oxidatiu és un procés àmpliament relacionat amb la funció mitocondrial, per la qual cosa esdevé clau en la fisiopatologia de la SL (Hayashi and Cortopassi 2015). Aquesta afirmació deriva de l'estudi de fibroblasts de pacients amb SL portadors de mutacions en el CI,

els quals presenten nivells alts de ROS (Valsecchi et al. 2013) i estrès oxidatiu manifestat en dany oxidatiu en el DNA i proteïnes. El tractament dels fibroblasts amb un inhibidor de la cinasa PKC $\beta$  aconsegueix reduir la producció de ROS a més de restablir l'activitat del CI (Wojtala et al. 2017). En aquest sentit, també es detecta un augment de proteïnes oxidades en el cervell de ratolins amb disfunció mitocondrial del CI (ratolí Ndufs4KO) (Quintana et al. 2010).

En el SNC, els astròcits tenen una funció cabdal en la regulació de l'estrès oxidatiu, alhora que mantenen l'homeòstasi del sistema abastint de substrats les neurones, preservant la integritat de la barrera hematoencefàlica, regulant l'activitat sinàptica i processant metabòlits cel·lulars (Verkhatsky and Nedergaard 2018). Per una banda, els astròcits protegeixen el SNC de l'estrès oxidatiu a través d'un potent sistema antioxidant, amb enzims com el glutatió, glutatió reductasa o glutamatcisteïna-lligasa, per tal d'eliminar els radicals lliures (Fernandez-Fernandez, Almeida, and Bolaños 2012). Per altra banda, davant determinades condicions patològiques com la disfunció mitocondrial, una activació prolongada dels astròcits (gliosis o astrogliosis) els converteix en grans productors de ROS alhora que secreten factors inflamatoris, promovent l'activació de la micròglia i desencadenant dany neuronal (Yaxing Chen et al. 2020; Sofroniew 2009). En relació amb la micròglia, la qual conforma el sistema immunitari resident en el SNC, també participa en el manteniment de la homeòstasi del teixit. No obstant, davant un estímul o dany neuronal prolongat com l'estrès oxidatiu, la micròglia pot esdevenir activada i secretar factors pro-inflamatoris, perjudicant el teixit circumdant i promovent pèrdua neuronal progressiva relacionada amb neurodegeneració (Subhramanyam et al. 2019). En aquest sentit, en diferents patologies neurodegeneratives, com la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Parkinson o l'esclerosi lateral amiotròfica, l'activació crònica de la micròglia juntament amb una gliosi perllongada actuen en detriment de la supervivència i les funcions neuronals (Pekny et al. 2016; Di Filippo et al. 2010), tal com succeeix en la SL degut a la disfunció mitocondrial (Lake et al. 2015). Particularment, l'anàlisi immunohistoquímic realitzat en el cervell de ratolins

## Introducció

Ndufs4KO rebel·la la presència de gliosis severa i micròglia reactiva en aquelles àrees cerebrals claus en l'evolució de la patologia de la SL (Quintana et al. 2010).

En conjunt, a nivell cel·lular, la disfunció mitocondrial provoca una depleció severa de l'energia en forma d'ATP, un desplaçament del metabolisme cel·lular en favor de la glicòlisi i estrès oxidatiu, tant a nivell neuronal com d'astròcits. A la vegada, l'activació dels astròcits i la reactivitat microglial exerceixen efectes en detriment del teixit desencadenant pèrdua neuronal i neurodegeneració.

### **3.7. Tractaments per la SL**

Actualment, no existeix cap tractament que permeti guarir la SL. Les úniques opcions terapèutiques es basen en reduir els símptomes i millorar la qualitat de vida general dels pacients. Una de les principals causes de la falta de tractaments efectius per la SL és la dificultat de dur a terme assaigs clínics, ja que els pacients tenen una esperança de vida molt curta i una gran variabilitat en els gens i vies implicades, complicant obtenir cohorts significatives (Baertling et al. 2014; Gerards, Sallevelt, and Smeets 2016).

No obstant, cal destacar l'existència de tractaments per casos molt concrets de SL amb mutacions determinades. N'és un exemple l'administració de tiamina i biotina en malalts amb mutacions en el gen SLC19A3, el qual és un transportador de tiamina (Brown 2014; Gerards, de Coo, and Smeets 2014) ja que en millora la simptomatologia (Gerards et al. 2013; Ortigoza-Escobar et al. 2014). A més a més, nivells alts de tiamina poden augmentar l'activitat de l'enzim PDH, fent que pacients amb mutacions en PDHA1 també mostrin una millora amb l'administració de tiamina (Brown 2014). Per tant, tot i que es desconeixen els mecanismes d'acció exactes, es recomana el tractament amb tiamina i biotina en tots aquells pacients amb sospita de patir SL, ja que no s'han reportat efectes secundaris (Lou 1981). Un altre cas de tractament efectiu pel SL és l'administració de coenzim Q<sub>10</sub> (CoQ10) en pacients amb

deficiència primària per aquest component, promovent una recuperació total o millora significativa en els dèficits neurològics presentats (Van Maldergem et al. 2002; López et al. 2006).

Deixant de banda els tractaments adreçats a una via metabòlica concreta, altres teràpies més generals per la SL van encaminades a reduir els nivells de ROS o intermediaris metabòlics tòxics, desviar la producció energètica de la OXPHOS, estimular la biogènesi mitocondrial, modificar la dinàmica mitocondrial o bé promoure la mitofagia (L. Chen et al. 2018).

En els últims anys, s'han estudiat els efectes beneficiosos de la rapamicina en un model animal de SL amb deficiència del CI, el ratolí *Ndufs4KO*. La rapamicina és un inhibidor de la via mTOR, estimulant el catabolisme d'aminoàcids en detriment de la glicòlisi i així reduint l'acumulació d'intermediaris com el piruvat (Vafai and Mootha 2013). Els ratolins tractats amb rapamicina mostraven una prolongació de la supervivència i millores en el fenotip motor, a la vegada que no desenvolupaven les lesions neuronals característiques de la SL (Johnson et al. 2013). Tot i aquests resultats prometedors, cal tenir present els efectes secundaris de la rapamicina tals com immunosupressió i hiperlipidèmia (Sage-Schwaede et al. 2019). Per aquest motiu, actualment la rapamicina no es considera un bon tractament pels pacients amb SL i recentment se n'ha retirat un assaig clínic (*ClinicalTrials.gov* identificador NCT03747328).

Paral·lelament, s'han desenvolupat tractaments basats en teràpia gènica focalitzats en reexpressar el gen mutat, mitjançant AAV (virus adeno-associat), o bé en utilitzar nucleases per eliminar el mtDNA causant d'heteroplasmia, gràcies a la tecnologia TALENs o CRISPR (Jo et al. 2015; Pereira et al. 2018). Una sola injecció intravenosa d'un AAV per restablir l'expressió del gen *Ndufs4* en el model animal de la SL *Ndufs4KO* va permetre allargar-ne la supervivència, millorar el fenotip motor així com augmentar l'activitat i la quantitat del CI (Silva-Pinheiro et al. 2020). Malgrat

aquests resultats prometedors, són necessaris més estudis adreçats a millorar el serotip i l'eficiència dels AAV aplicats en humans.

Per concloure, tot i l'existència de diferents tractaments que permeten reduir o retardar la simptomatologia en casos concrets de la SL, avui en dia encara manca un tractament beneficiós pel conjunt de malalties mitocondrials, en part degut a la gran heterogeneïtat clínica i genètica. Tot això posa de manifest la necessitat d'elucidar els mecanismes subjacents a la disfunció mitocondrial i aprofundir en la seva recerca per tal d'avançar en la seva cura.

#### **4. Models animals de la SL**

Una part imprescindible en el desenvolupament de tractaments per la SL es basa en disposar de models animals amb un fenotip similar al dels humans per tal de realitzar assaigs preclínic efectius. Els models animals existents pel SL compten des dels models biològics més simples com *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) fins a la complexitat dels mamífers com els ratolins (Kanabus, Heales, and Rahman 2014).

Un exemple de model animal pel SL en *Drosophila melanogaster* és la deficiència del gen homòleg en mamífers *Surf1*, l'afectació més habitual en humans amb SL amb deficiència del CIV. En aquest cas, en *Drosophila* s'ha observat una reducció en el consum d'oxigen, disminució en la respiració i deficiència selectiva del CIV (Da-Rè et al. 2014). Per altra banda, mutacions en el gen ND23 (homòleg del gen *Ndufs8* en mamífers) en *Drosophila melanogaster* desencadenen un fenotip semblant al presentat en pacients de la SL amb reducció de la supervivència, neurodegeneració, morfologia mitocondrial alterada i reducció en els nivells d'ATP (Loewen and Ganetzky 2018). L'estudi d'aquest model va posar en relleu la importància de la comunicació mitocondri-nucli en la severitat de la malaltia.

Així mateix, s'ha utilitzat el nematode *C. elegans* com a model animal de la SL. En aquest sentit, el desenvolupament de diferents nematodes mutants per gens relacionats amb la patologia ha permès posar de manifest els beneficis de tractaments com la riboflavina o l'àcid sulfhídric en augmentar els nivells d'ATP, reduir ROS i incrementar la mobilitat i supervivència dels subjectes (Grad and Lemire 2006; Fox et al. 2021).

En els últims anys, gràcies a l'avenç tecnològic en l'edició gènica s'han generat diversos ratolins com a model de malalties mitocondrials, i en particular per la SL. D'aquesta manera, existeixen models dirigits al mtDNA i al nDNA per mitjà de la deleció total o condicional en determinats teixits per diferents subunitats de l'ETC, factors d'assemblatge o gens relacionats en el manteniment i expressió del mtDNA. Cal destacar que alguns d'aquests models de ratolí presenten letalitat embrionària, per la qual cosa cal restringir la mutació a certs teixits, com múscul esquelètic o SNC, per tal de ser viables. En d'altres casos, les deficiències mitocondrials no desencadenen un fenotip en el ratolí, per bé que d'altres mostren patologies molt semblants a les presentades en pacients (Taula 4) (Kanabus, Heales, and Rahman 2014).

**Taula 4. Alguns dels ratolins model existents per la síndrome de Leigh amb afectació de diferents gens nuclears causant deficiència mitocondrial.** Cada model animal recapitula en menor o major mesura els símptomes presentats pels pacients, sent els ratolins *Ndufs4KO* i *Par1<sup>-/-</sup>* (ressaltats en blau) els més fidedignes amb la patologia humana.

Gen	Fenotip humà	Ratolí model	Fenotip ratolí
<b><i>Cox10<sup>1</sup></i></b>	Síndrome de Leigh, deficiència CIV	<i>Cox10KO</i> ( <i>Cox10<sup>sm/sm</sup></i> )	5% activitat CIV múscul Miopatia lleu Reducció esperança de vida Sense alteracions neuronals
<b><i>Cox15<sup>2</sup></i></b>	Síndrome de Leigh, deficiència CIV	<i>Cox15<sup>sm/sm</sup></i>	Reducció activitat CIV múscul Fenotip motor Reducció esperança de vida Sense alteracions neuronals

## Introducció

<b><i>Foxred1</i><sup>3</sup></b>	Síndrome de Leigh, deficiència CI	siRNA-Foxred1 en C57BL6	Tremolors Reducció mobilitat espontània Neurodegeneració en estriat i ganglis basals
<b><i>Ndufs4</i><sup>4</sup></b>	Síndrome de Leigh, deficiència CI	Ndufs4KO	50% activitat CI Fenotip motor greu Encefalomiopatia severa Reducció esperança de vida (P50)
<b><i>Par1</i><sup>5</sup></b>	Indeterminat, possible relació malaltia de Parkinson	Par1 <sup>-/-</sup>	Reducció activitat CIII i CoQ10 Fenotip motor greu Encefalomiopatia severa Reducció esperança de vida (P40)
<b><i>Sco2</i><sup>6</sup></b>	Cardioencefalomiopatia infantil, deficiència CIV	Sco2 KO/KI Sco2 KI/KI	Reducció activitat complexes ETC Debilitat muscular Esperança de vida normal Sense alteracions neuronals
<b><i>Sdhc</i><sup>7</sup></b>	Síndrome similar a Leigh, deficiència CII	Sdhc <sup>fl/fl</sup>	Alteració metabòlits TCA Reducció esperança de vida Disfunció motora Sense alteracions neuronals
<b><i>Slc25a4</i><sup>8</sup></b>	Diferents afectacions neurològiques, síndrome de Leigh	<i>atc/atc</i>	Hipoplàsia del cerebel Lesions neuronals diferents de SL Reducció esperança de vida
<b><i>Surf1</i><sup>9</sup></b>	Síndrome de Leigh, deficiència CIV	Surf1 <sup>loxP</sup>	50% activitat CIV Fenotip motor lleu Prolongació esperança de vida Sense alteracions neuronals
<b><i>Taco1</i><sup>10</sup></b>	Síndrome de Leigh, deficiència CIV	Taco1 <sup>mut/mut</sup>	Disminució contingut CIV Disfunció motora Esperança de vida normal Sense alteracions neuronals

<sup>1</sup> (F. Diaz et al. 2005); <sup>2</sup> (Viscomi et al. 2011); <sup>3</sup> (Salama et al. 2019); <sup>4</sup> (Kruse et al. 2008); <sup>5</sup> (Cipolat et al. 2006; Spinazzi et al. 2019); <sup>6</sup> (H. Yang et al. 2010); <sup>7</sup> (Al Khazal et al. 2019); <sup>8</sup> (Terzenidou et al. 2017); <sup>9</sup> (Pulliam et al. 2014); <sup>10</sup> (Richman et al. 2016) (KO= *knockout*; KI= *knockin*).

Un dels primers models animal de mamífer per una malaltia mitocondrial en un gen nuclear va ser la deleció constitutiva del gen *Surf1* en ratolins (Agostino 2003). Degut a la inserció d'un casset NEO per truncar la funció del gen, es va desencadenar letalitat embrionària en el 90% dels ratolins mutats, impossibilitant la seva aplicació

com a model animal. Posteriorment, seguint una estratègia gènica alternativa, es va desenvolupar un nou ratolí amb disfunció del gen *Surf1* (ratolí *Surf1<sup>loxP</sup>*) que segueix una distribució d'herència mendeliana (Dell'Agnello et al. 2007). Els ratolins *Surf1<sup>loxP</sup>* presenten una reducció del 50% en l'activitat del CIV, mentre que en cor i múscul esquelètic no mostren diferències en nivells de ROS, potencial de membrana o producció d'ATP en comparació als controls (Pulliam et al. 2014). Així mateix, tampoc exhibeixen afectacions neurològiques però sí alguns problemes motors lleus i alts nivells de lactat en sang. Curiosament, l'esperança de vida dels ratolins *Surf1<sup>loxP</sup>* és més prolongada que la dels controls, no sent per tant un model animal adequat per la SL (Dell'Agnello et al. 2007; Pulliam et al. 2014).

Uns resultats semblants es van obtenir en generar ratolins deficient pels gens *Cox10* i *Cox15* (ratolí *Cox10<sup>sm/sm</sup>* i *Cox15<sup>sm/sm</sup>*, respectivament), els quals són enzims que participen en la generació del grup hemo del CIV. Mutacions en aquests gens estan descrites en pacients de la SL. En aquest cas, la deleció constitutiva de *Cox10* o *Cox15* eren letals a nivell embrionari, obligant a generar un model condicional en múscul esquelètic (F. Diaz et al. 2005; Viscomi et al. 2011). D'aquesta manera, es van obtenir ratolins amb deficiència del CIV en múscul que presentaven miopatia i reducció en l'esperança de vida, en el cas del ratolí *Cox15<sup>sm/sm</sup>* juntament amb fenotip motor. Tot i que aquests models animals no presenten les lesions neuronals característiques de la SL, constitueixen una bona eina per l'estudi d'altres teixits, com és el cas del múscul esquelètic, en la progressió de la malaltia (Civiletto et al. 2015).

Altrament, la proteasa PARL (*Presenilin-associated rhomboid-like*) es troba ubicada en la MMI i participa en la dinàmica mitocondrial però la seva funció fisiològica no està determinada, per bé que la seva disfunció s'associa a la malaltia de Parkinson i la diabetis en humans. Es va generar un ratolí amb deficiència pel gen *Parl* (*Parl<sup>-/-</sup>*) per tal d'estudiar la seva implicació en l'apoptosi (Cipolat et al. 2006), però no va ser fins anys més endavant que se'ls va descriure una neurodegeneració severa amb necrosis semblant a la presentada per pacients amb SL (Spinazzi et al. 2019). Els



## Introducció

ratolins  $\text{Parl}^{-/-}$  mostren una mort prematura (dia post-natal 40, P40) amb endarreriment en el creixement i afectacions motores severes. Bioquímicament, la simptomatologia s'associa a dèficits en l'activitat del CIII i la biogènesi de CoQ10. Per tant, el ratolí  $\text{Parl}^{-/-}$  pot arribar a ser un bon model per la SL, ja que recapitula les alteracions neuronals i motores presentades pels humans.

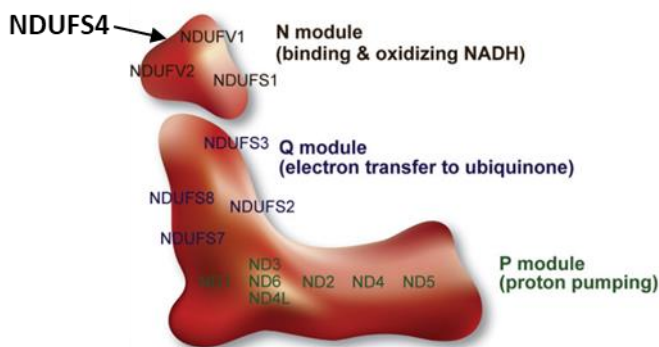
Per últim, un dels models animals per la SL més utilitzats fins a la data és el ratolí  $\text{Ndufs4KO}$ , el qual presenta encefalomiopatia progressiva severa amb disfunció motora (Kruse et al. 2008). La subunitat  $\text{NDUFS4}$  (NADH:ubiquinona oxidoreductasa subunitat S4) forma part del CI de la cadena transportadora d'electrons. Tal com ja s'ha comentat, mutacions en aquest gen s'han descrit en diversos pacients diagnosticats amb SL (Ortigoza-Escobar et al. 2016). La deficiència del gen  $\text{Ndufs4}$  en els ratolins recapitula la majoria dels signes clínics presents en els humans, incloent una reducció en la supervivència i un fenotip motor molt sever, entre d'altres. A més a més, a mesura que la malaltia progressa, mostren deteriorament neuronal en les diferents àrees del cervell característiques de la SL (Quintana et al. 2010). Totes aquestes especificitats fan que el ratolí  $\text{Ndufs4KO}$  sigui un dels millors models animal per l'estudi de la SL i permeti utilitzar-lo en l'exploració de nous tractaments.

### 4.1. Ratolí $\text{Ndufs4KO}$

El ratolí  $\text{Ndufs4KO}$  presenta una mutació constitutiva degut a la deleció de l'exó 2 del gen nuclear  $\text{Ndufs4}$ , provocant un canvi en el patró de lectura donant lloc a una proteïna truncada que no és detectable per *western blot* (Kruse et al. 2008).

La subunitat  $\text{NDUFS4}$ , d'uns 18 kDa, forma part del mòdul N del CI de l'ETC i està codificada en el nDNA. El CI és una estructura multiproteica en forma de L constituïda per 3 mòduls amb funcions establertes: el mòdul N, és l'entrada dels electrons procedents del NADH, el mòdul Q, transfereix els electrons a l'ubiquinona, i per últim, el mòdul P, s'encarrega de bombejar  $\text{H}^+$  cap a l'espai intermembranós (Figura

5) (Fassone and Rahman 2012; Parey et al. 2020). S'han descrit 44 subunitats conformant el CI, de les quals 7 es troben codificades en el mtDNA i les 37 restants en el nDNA (Distelmaier et al. 2008).



**Figura 5. Esquema de l'estructura del complex I mitocondrial en mamífers.** El complex I està format pel mòdul N, per on entren els electrons procedents del NADH; el mòdul Q, destinat a transferir els electrons a l'ubiquinona i el mòdul P, encarregat de bombejar protons a l'espai intermembranós. Adaptat de Mimaki et al. 2012.

Mecanísticament, s'ha observat que la deficiència de NDUFS4 provoca alteracions en l'assemblatge del CI i en canvia l'estructura, tal com s'ha descrit en un model de llevat (Parey et al. 2019). Tot i això, s'ha observat que la unió del CI amb el CIII en els supercomplexes mitiga part dels defectes estructurals del CI deficient per NDUFS4 estabilitzant la seva configuració (Calvaruso et al. 2012; Parey et al. 2019). Per aquest motiu, en mostres de teixit de ratolins *Ndufs4*KO és possible detectar la presència de CI per mitjà de BNGE (*Blue native gel electrophoresis*), tot i mostrar una abundància més reduïda que en els controls (Figura 6A). Aquesta deficiència en l'estructura del CI es tradueix en una reducció de més del 50% de l'activitat del CI (Figura 6B) (Kruse et al. 2008).

Els ratolins *Ndufs4*KO a partir de P30, punt en el que assoleixen el seu màxim de pes, desencadenen una progressió de símptomes tals com atàxia severa, pèrdua d'equilibri, ceguera, problemes auditius, en alguns casos epilèpsia, letargia i reducció de 2°C en la temperatura corporal. D'altra banda, els ratolins heterozigots amb una

## Introducció

sola còpia de l'al·lel mutat per *Ndufs4* no es poden diferenciar dels animals *wild type*, ni pel seu comportament ni per la seva fisiologia.

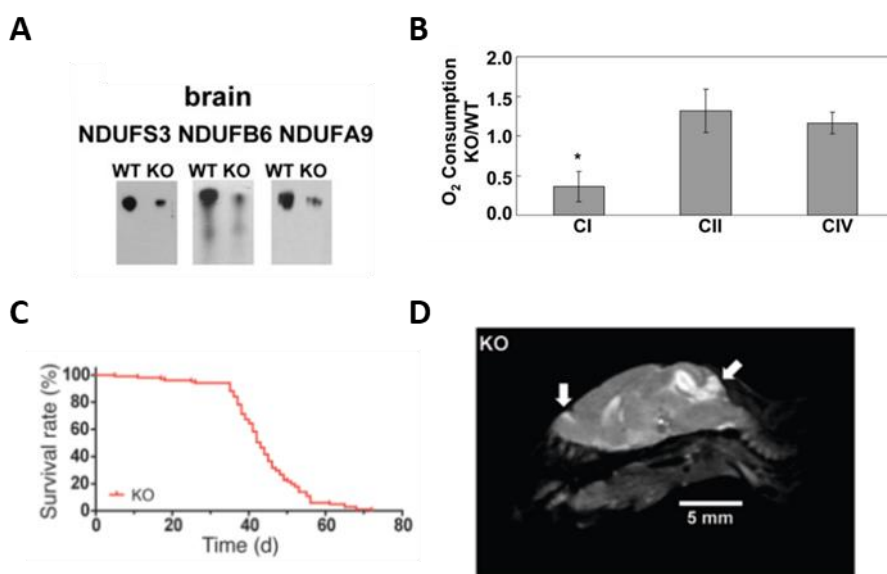
A nivell fisiològic, els ratolins *Ndufs4KO* presenten alteracions respiratòries greus a mesura que progressa la patologia. En particular, s'observen episodis d'apnea, alteracions en la freqüència respiratòria i un augment en el volum corrent (volum d'aire inspirat i expirat en cada cicle de respiració) (Quintana, Zanella, et al. 2012). A partir de P35, els ratolins amb deficiència mitocondrial pateixen un deteriorament ràpid de les funcions motores, perden pes i acaben morint prematurament al voltant de P50 (Figura 6C) (Kruse et al. 2008). A nivell neurològic, de manera anàloga als humans, els ratolins *Ndufs4KO* mostren astrogliosis i reactivitat microglial en el nucli vestibular (NV), bulb olfactiu (BO), cerebel i nucli olivar inferior de manera progressiva a mesura que avança la malaltia. En aquestes mateixes àrees cerebrals es manifesta vacuolació del teixit i pèrdua neuronal. En els últims estadis de la malaltia, s'observen danys evidents en el teixit amb proliferació vascular al NV i el cerebel (Quintana et al. 2010).

Aquestes lesions són observables en imatges de RM per T2 ponderada, tot mostrant senyals hiperintenses simètriques i bilaterals corresponents a lesions en els nuclis del cerebel, els lòbuls posteriors del cerebel, BO i NV en els ratolins *Ndufs4KO*, les quals no es detecten en els animals controls (Figura 6D) (Quintana, Zanella, et al. 2012). Cal destacar que aquestes lesions cerebrals tan característiques són les mateixes que presenten els pacients diagnosticats per la SL, a excepció d'afectacions en els ganglis basals. Així mateix, s'ha descrit que els ratolins *Ndufs4KO* mostren hipersensibilitat als anestèsics volàtils (isoflurà i halotà) i al propofol (no-volàtil), mentre que són resistents a la ketamina (no-volàtil) (Quintana, Morgan, et al. 2012).

Bioquímicament, totes aquestes alteracions histològiques s'han correlacionat amb un augment de l'estrès oxidatiu i iniciació de la via extrínseca de l'apoptosi, per mitjà de la detecció de proteïnes oxidades en el BO i augment de caspasa-8, respectivament, en mostres de ratolins *Ndufs4KO*. Pel que fa als mitocondris dels

animals mutats, presenten alteracions estructurals en les àrees afectades, tals com crestes mitocondrials compactades i/o inflades (Quintana et al. 2010). Metabòlicament, es detecten nivells alts de lactat en sang en ratolins *Ndufs4*KO en estadis avançats de la malaltia (Kruse et al. 2008).

Posteriorment, estudis emprant un altre ratolí model amb deficiència del gen *Ndufs4* restringida al SNC (ratolí NesKO) van posar de manifest que la disfunció mitocondrial en aquest òrgan és l'origen principal del fenotip presentat pels ratolins amb deleció constitutiva de *Ndufs4* (Quintana et al. 2010). En conjunt, el ratolí *Ndufs4*KO és un bon model per estudiar els mecanismes neurodegeneratius i la progressió dels símptomes en les malalties mitocondrials i en concret en la SL.



**Figura 6. Reduïció de l'activitat del complex I i fenotip sever amb neuropatologia en delectar part del gen *Ndufs4* de manera constitutiva en un model de ratolí del síndrome de Leigh. A)** Electroforesis en gel natiu en mostres de cervell de ratolins *Ndufs4*KO i controls utilitzant les principals proteïnes representatives dels subcomplexes del CI. En tots els casos, les mostres d'animals *Ndufs4*KO mostren una reduïció en els nivells del CI intacte. Adaptat de Kruse et al. 2008. **B)** Consum d'oxigen en mostres de fetge de ratolins *Ndufs4*KO respecte controls. L'activitat del CI és menys del 50% dels controls, mentre que no hi ha diferències en l'activitat del CII i CIV. Adaptat de Kruse et al. 2008. **C)** Supervivència disminuïda dels ratolins *Ndufs4*KO (n=101). Adaptat de Quintana et al. 2012. **D)** Ressonància magnètica de T2 ponderada en cervell de ratolí *Ndufs4*KO d'edat avançada, el qual presenta zones d'hiperintensitat (àrees blanques indicades amb fletxes) en el BO, la zona dorsal del tronc de l'encèfal i el cerebel. Adaptat de Quintana et al. 2012.

## 5. Còrtex cerebral

En el context de la SL, la presència de lesions neuronals en els ganglis basals i/o tronc de l'encèfal és la característica neuropatològica més comú (Lake et al. 2015; Sofou et al. 2014) malgrat en diferents casos també s'especifiquen alteracions en el còrtex cerebral, cerebel, tàlem o medul·la espinal (Cavanagh and Harding 1994; Sofou et al. 2018). En referència al còrtex cerebral, diferents estudis en descriuen la seva implicació en el 18-25% dels pacients amb SL (Sofou et al. 2018; Ortigoza-Escobar et al. 2016), encara que en molts anàlisis manca una menció específica de l'estat del còrtex.

El còrtex cerebral, escorça cerebral o neocòrtex és una estructura cerebral complexa i la més nova evolutivament que augmenta la capacitat de processament davant d'un ambient canviant (Prasad, Carroll, and Sherman 2020). Participa en diferents funcions com són la percepció, moviments voluntaris, memòria, cognició i emocions. A més a més, en els humans està relacionat amb el llenguatge i en la utilització d'objectes. Es calcula que l'escorça cerebral humana conforma el 80% de la massa cerebral, mentre que només conté el 20% de totes les neurones. Això és degut a que està formada per neurones més grans, amb projeccions axonals llargues i amb múltiples connexions mitjançant dendrites, axons i sinapsis (Van Essen, Donahue, and Glasser 2018).

Al 1909, l'anatomista alemany Korbinian Brodmann va dividir el còrtex cerebral dels primats en 52 àrees basant-se en l'arquitectura histològica de les cèl·lules gràcies al marcatge amb Nissl i la seva observació al microscopi (Brodmann 1909; Triarhou 2021). Actualment, la classificació de les diferents àrees corticals es basa en altres paràmetres com són la seva funció, electrofisiologia, connexions o patró gènic d'expressió.

Tal com va descriure el metge espanyol Ramón y Cajal, la composició cel·lular del còrtex és heterogènia i diversificada (Ramón y Cajal 1988). Actualment, segons el seu patró d'expressió i funcions es defineixen diferents tipus cel·lulars en el còrtex:

oligodendròcits (41%), cèl·lules piramidals (22%), interneurons (10%), cèl·lules endotelials (9%), astròcits (8%) o micròglia (5%) (Zeisel et al. 2015). D'aquestes dades se n'extreu que pràcticament el 70-80% de les neurones corticals són excitatòries [cèl·lules piramidals o neurones de projecció (NP)] mentre que el 20-30% restant són inhibidòries (interneurones) (Hu, Gan, and Jonas 2014). En el còrtex cerebral les NP estan distribuïdes en 6 capes o làmines en l'anomenada placa cortical, on cada capa presenta tipus neuronals amb similitud morfològica, de connexions i formació temporal durant el desenvolupament (Cooper 2008). El còrtex adult està format per la zona marginal en la part més dorsal, amb cèl·lules de Cajal-Retzius que acaba esdevenint la capa 1; la placa cortical, formada per les 5 capes de NP; i la zona ventricular, ubicada en la part més interna on es localitzen els progenitors neuronals (Gupta, Tsai, and Wynshaw-Boris 2002). La capa 1 està ubicada en la part dorsal del còrtex, mentre que la capa 6 és la més profunda.

### **5.1. Formació del còrtex: corticogènesi**

Durant el desenvolupament, el còrtex cerebral deriva principalment de la part dorsal del telencèfal (Figura 7A) (Agirman, Broix, and Nguyen 2017). De manera general, les neurones corticals es poden classificar en excitatòries (NP) o bé inhibidòries (interneurones), on cadascun d'aquests tipus neuronals deriva de diferents zones proliferatives durant la corticogènesi (Lopez-Bendito et al. 2008).

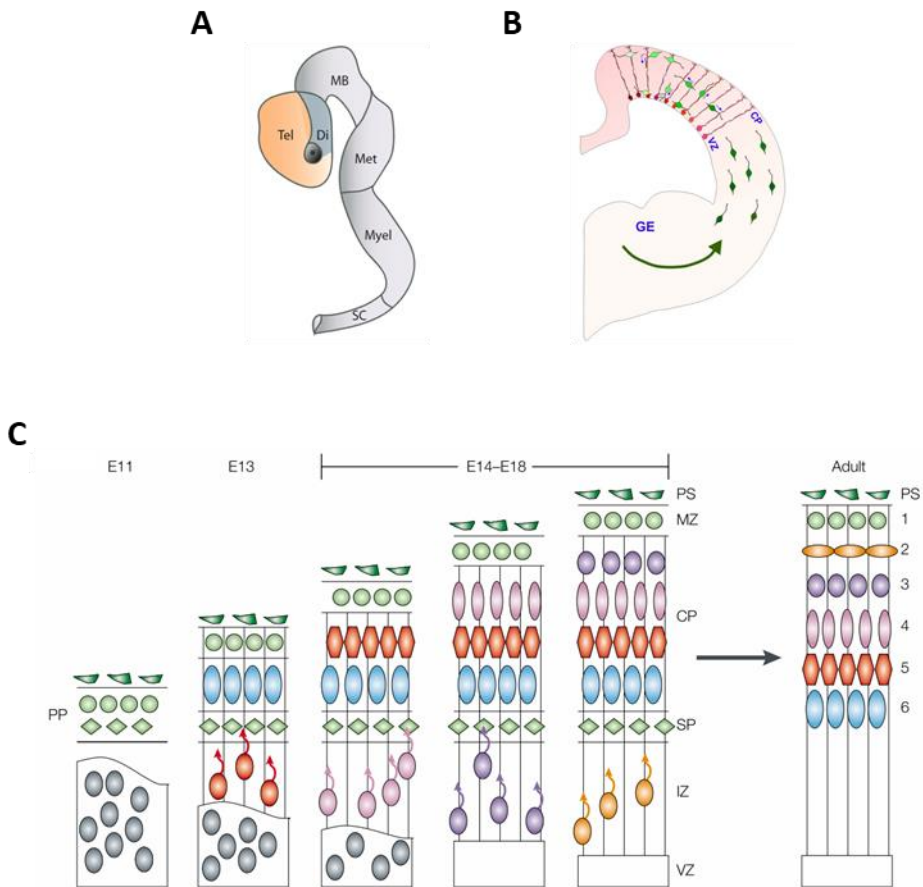
Per una banda, les interneurons, caracteritzades per expressar el neurotransmissor inhibidor GABA (àcid  $\gamma$ -aminobutíric), fan connexions curtes i locals generant-se en l'eminència gangliònica, la qual està ubicada en la part ventral del telencèfal durant el desenvolupament. Posteriorment, les interneurons migren de manera tangencial per envair la placa cortical en formació (Figura 7B) (Anderson et al. 2001; Yokota et al. 2007). Les interneurons GABAèrgiques conformen un grup heterogeni de neurones que mitjançant la inhibició sinàptica són essencials per establir i mantenir

## Introducció

la integració sinàptica així com l'excitabilitat del sistema en el còrtex cerebral (Bartolini, Ciceri, and Marín 2013).

Per altra banda, les NP són neurones glutamatèrgiques amb morfologia piramidal que transmeten informació de manera intracortical, subcortical i subcerebelar gràcies a axons llargs (Molyneaux et al. 2007). Les NP deriven de divisions asimètriques de les cèl·lules glials radials (CGR), les quals estan ubicades en la zona ventricular del còrtex (Haubensak et al. 2004; Noctor et al. 2004). Una vegada s'han format en la zona ventricular, duen a terme un procés de migració radial complex i temporalment regulat per tal d'assolir la placa cortical. Les primeres neurones que es generen migren per ocupar les capes profundes, mentre que les neurones originades més tard, migren a través de les primeres neurones per ocupar les capes més superficials (Figura 7C) (Nadarajah et al. 2001). Successives fases de divisions i migracions tan característiques donen lloc al patró dins-fora amb 6 capes organitzades en la placa cortical (Cooper 2008; He et al. 2015). En el còrtex cerebral madur existeixen diferents poblacions de NP ubicades en les diverses capes corticals, les quals tenen característiques morfològiques úniques, un patró d'expressió gènica concret i exerceixen diferents funcions (Zeisel et al. 2015). La gran complexitat i diversitat dels subtipus de NP fa que sigui difícil classificar-les. Tot i així, generalment es té en compte la seva morfologia, electrofisiologia, connectòmica i expressió gènica (Migliore and Shepherd 2005; Molyneaux et al. 2007).

El procés de la neurogènesi cortical pel qual s'estableixen les diferents capes té lloc quasi exclusivament durant el desenvolupament embrionari, entre els dies embrionaris 10,5 i 18,5 (E10,5-E18,5) en els ratolins (Marín and Rubenstein 2003; Götz and Huttner 2005).

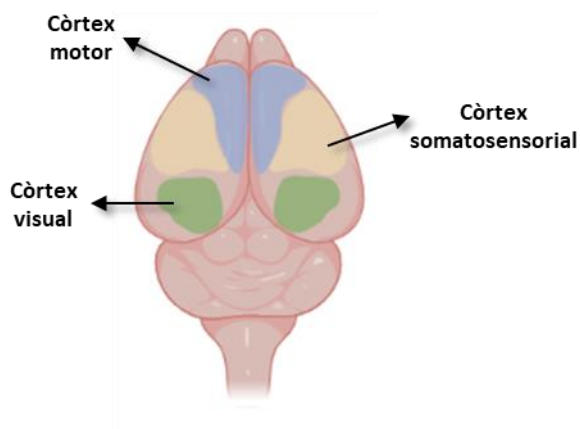


**Figura 7. Formació del còrtex cerebral durant el desenvolupament, migració d'interneurones i neurones de projecció. A)** En el desenvolupament el tub neural dona lloc a les vesícules primàries del prosencèfal, mesencèfal (MB), romboencèfal i medul·la espinal (SC). Seguidament, el prosencèfal es divideix en telencèfal (Tel) i diencèfal (Di), mentre que el romboencèfal forma el metencèfal (Met) i mielencèfal (Myel). El còrtex cerebral deriva de la part dorsal del telencèfal (coloració taronja). Figura adaptada de Agirman, Broix, and Nguyen 2017. **B)** Migració tangencial de les interneurones (verdes) des de l'eminència gangliònica (GE) cap a la placa cortical (CP) o la zona ventricular (VZ), on interaccionen amb la glia radial (vermelles). Figura adaptada de Yokota et al. 2007. **C)** Migració de les neurones de projecció durant el desenvolupament amb el patró dins-fora per tal d'organitzar el còrtex adult en 6 capes (PP: pre-placa; PS: superfície pial; MZ: zona marginal; SP: sub-placa; IZ: zona intermèdia). Figura adaptada de Gupta, Tsai, and Wynshaw-Boris 2002. Els esquemes no estan a escala.



## 5.2. Diferents àrees corticals descrites en el cervell de ratolins

A diferència del cervell dels primats, l'absència de circumvolucions i solcs en l'escorça cerebral dels ratolins en dificulta l'estudi de l'anatomia i la delineació de les diferents zones. Per aquest motiu, la descripció de les àrees corticals en ratolins és predominantment funcional, separant àrees com el còrtex prefrontal, còrtex motor, còrtex somatosensorial, còrtex auditiu, còrtex visual, còrtex cingulat i còrtex associatiu (Figura 8) (Schröder, Moser, and Huggenberger 2020; K. Franklin and Paxinos 2007). A més a més, algunes d'aquestes zones també es poden dividir en àrees corticals primàries, les quals reben i generen estímuls directes d'altres zones cerebrals, o bé àrees corticals secundàries, que connecten principalment amb les àrees corticals primàries. Tal com succeeix en els primats, tant el còrtex motor com el còrtex somatosensorial dels rosegadors presenten una distribució somatotípica en la que les diferents parts del cos estan representades en zones corticals definides, l'extensió i volum de les quals depèn de la sensibilitat de cada àrea (Muret and Makin 2021).



**Figura 8.** Esquema de la localització del còrtex motor, còrtex somatosensorial i còrtex visual en el cervell de ratolí adult en una visió dorsal.

### 5.2.1. Còrtex motor

El còrtex motor és la zona del còrtex que proporciona informació a la medul·la espinal per determinar gran part dels moviments. En concret, participa en la planificació, control i execució de moviments voluntaris precisos i la seva disrupció causa dèficits motors. Tradicionalment, s'havia considerat que el còrtex participava en la definició del moviment i no pas en el seu inici o execució (Castro 1972; Passingham, Perry, and Wilkinson 1983; Fogassi et al. 2001). Possiblement aquesta afirmació era deguda a la metodologia experimental utilitzada, la qual presentava manca d'especificitat temporal en l'anàlisi dels moviments ja que es basava en l'ablació total o parcial del còrtex. Recentment, gràcies a la introducció de les tècniques d'optogenètica s'ha descrit que el còrtex motor està implicat en iniciar moviments precisos en ratolins, com per exemple, agafar aliments (J.-Z. Guo et al. 2015).

Actualment, es considera que el còrtex motor és important tant en el control dels moviments com en l'aprenentatge de moviments. En primer lloc, l'escorça motora és essencial en la producció de moviments precisos independents d'aprenentatge. En segon lloc, dirigeix certs tipus de moviments apresos sense ser el productor final del moviment (Peters, Liu, and Komiyama 2017). A més a més, es creu que aquestes funcions poden ser específiques de tipus neuronals o capes corticals concretes. Les capes superiors 2/3 estarien especialitzades en l'aprenentatge de moviments, la capa profunda 5b, la qual presenta projeccions a la medul·la espinal, estaria relacionada amb un sistema més general de dirigir els moviments, mentre que la capa 5a participaria en les dues funcions gràcies a les projeccions en el mateix còrtex i l'estriat (Masamizu et al. 2014). Addicionalment, en el còrtex motor es distingeix el còrtex motor primari (M1), en el qual s'inicien les projeccions dirigides a la medul·la espinal per tal de realitzar els moviments voluntaris, i el còrtex motor secundari (M2), com a zona associativa del sistema motor per guiar accions precedides d'estímuls sensorials (Schröder, Moser, and Huggenberger 2020).

### 5.2.2. Còrtex somatosensorial

El còrtex somatosensorial és l'àrea cerebral que rep i processa la informació sensorial obtinguda del tacte referent a la nocicepció i propiocepció. La major part dels estímuls aferents sensorials processats en el còrtex cerebral són transferits a través de diferents nuclis del tàlem procedents de la medul·la espinal amb informació generada en la perifèria (J. D. Nguyen and Duong 2021) o bé a través del nervi trigemin amb la informació procedent del cap i la cara (Dingle et al. 2019). El còrtex somatosensorial primari (S1) és la via principal d'entrada d'aquests estímuls (Schröder, Moser, and Huggenberger 2020). Neuroanatòmicament, cada regió del cos està representada en una zona del còrtex somatosensorial en els ratolins (Taula 5).

**Taula 5. Àrees sensorials corticals definides en el cervell de ratolins.**

Abreviació	Descripció àrea
S1BF	Còrtex somatosensorial primari, zona de barrils
S1DZ	Còrtex somatosensorial primari, zona disgranular
S1FL	Còrtex somatosensorial primari, zona extremitats anteriors
S1HL	Còrtex somatosensorial primari, zona extremitats posteriors
S1J	Còrtex somatosensorial primari, zona mandíbula
S1Sh	Còrtex somatosensorial primari, zona espatlla
S1Tr	Còrtex somatosensorial primari, zona del tronc
S1ULp	Còrtex somatosensorial primari, zona del llavi superior
S2	Còrtex somatosensorial secundari

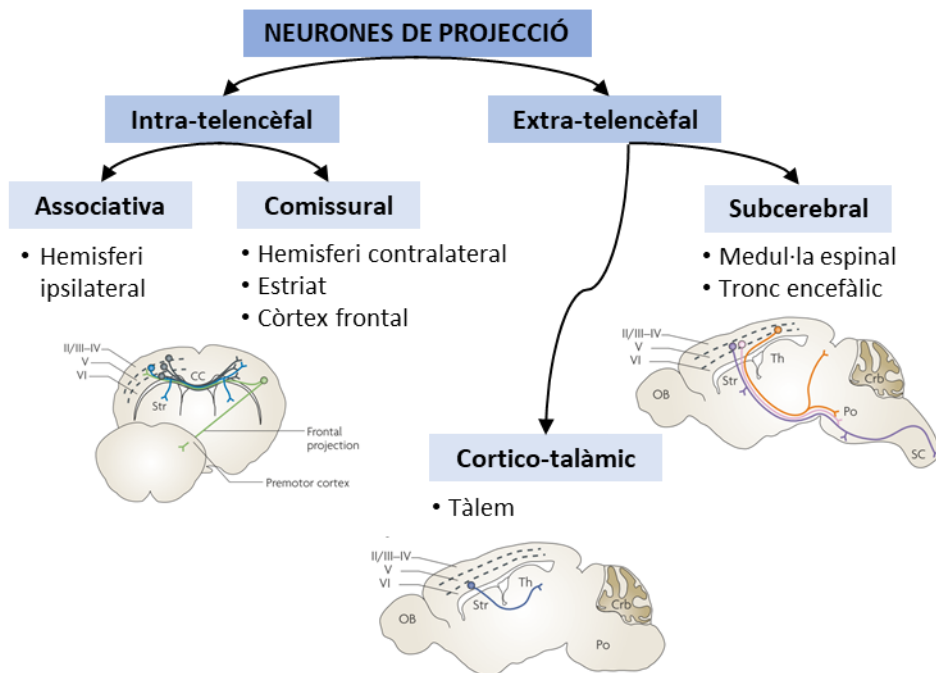
Per tal de generar una resposta motora coordinada, les àrees corticals del S1 i M1 estan connectades de manera recíproca (Petrof, Viaene, and Sherman 2015; Rocco-Donovan et al. 2011). Determinats aspectes motors tals com mastegar, la coordinació motora precisa, la força de subjecció i determinar el pes d'un objecte es veuen alterats en bloquejar les projeccions entre el S1 i el M1 en primats (Pavlidis, Miyashita, and Asanuma 1993; Brochier et al. 1999).

El còrtex somatosensorial secundari (S2) està àmpliament connectat de manera recíproca amb el còrtex S1, així com amb d'altres zones cerebrals tals com el tàlem, l'hipocamp i l'amígdala (Minamisawa et al. 2018; Brett-Green et al. 2004; Bellistri et al. 2013; Kropf et al. 2019). Aquest patró de projeccions fa que les àrees secundàries sensorials siguin necessàries per emmagatzemar, processar i retenir la informació sensorial, mentre que les àrees primàries estan més relacionades amb rebre de manera directa la informació perifèrica sensorial (Condylys et al. 2020; J. L. Chen et al. 2015).

### **5.3. Principals projeccions del còrtex**

Diversos tipus de NP participen en les múltiples connexions d'entrada i sortida d'informació entre el mateix còrtex cerebral i amb d'altres àrees del cervell. Tradicionalment, la classificació de les NP segons les àrees de projecció ha estat en intra-telencefàliques, quan s'estableixen connexions entre hemisferis corticals o estriat; o bé extra-telencefàliques (corticofugal), quan s'estableixen connexions amb tàlem, tronc de l'encèfal o medul·la espinal (Figura 9) (Harris and Shepherd 2015; Matho et al. 2021).

Les neurones de les capes superiors 2 i 3 juntament amb les neurones de les capes profundes 5 i 6, creen connexions cortico-corticals, incloent projeccions ipsilaterals, projeccions contralateral a través del cos callós i connexions amb l'estriat. Per altra banda, algunes de les neurones de la capa profunda 5 projecten distalment, cap a la medul·la espinal, mesencèfal i pons, mentre que la capa 6 cortical projecta a diferents nuclis del tàlem (Leone et al. 2008; Woodworth et al. 2012). Les vies corticofugals (capes 5 i 6) són les que permeten al còrtex comunicar-se amb la resta del cervell i influir en el comportament (Prasad, Carroll, and Sherman 2020).



**Figura 9. Esquema dels principals subtipus de neurones de projecció del còrtex cerebral segons les àrees de projecció.** Es divideixen en neurones amb projecció intra-telencèfalica i extra-telencèfalica. A la vegada, el primer grup es subdivideix en aquelles neurones que projecten ipsilateralment (associatives) o aquelles que projecten contralateralment o a l'estriat a través del cos callós i també al còrtex frontal (comissural). En el segon grup, es troben les neurones amb projecció a diferents nuclis del tàlem (cortico-talàmiques) i les que connecten amb el tronc de l'encèfal i la medul·la espinal (subcerebral). Adaptat de Molyneaux et al. 2007.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, el tàlem és la principal zona cerebral d'entrada d'informació al còrtex (Schröder, Moser, and Huggenberger 2020). Pel que fa al còrtex motor, aquest rep projeccions talàmiques procedents del cervell i dels ganglis basals, esdevenint així un centre d'integració del sistema motor (Peters, Liu, and Komiyama 2017). La informació derivada del cervell inicia o modula els moviments, mentre que la informació provinent dels ganglis basals guia la selecció dels moviments (Kaneko 2013). Paral·lelament, altres nuclis talàmics tals com els nuclis medials posteriors o nuclis ventrals medials posteriors projecten a diferents capes del còrtex somatosensorial per tal d'integrar la informació sensorial (Price et al. 2006; Castejon, Barros-Zulaica, and Nuñez 2016).

En l'organització dels circuits corticals, clàssicament s'ha descrit que les neurones excitatòries projecten tant localment com a llarg abast, mentre que les neurones inhibidores només estableixen connexions locals (Holmgren et al. 2003; Stokes and Isaacson 2010; Silberberg and Markram 2007). No obstant, recentment s'ha demostrat l'existència de projeccions corticals inhibidores de llarg abast (Tamamaki and Tomioka 2010; Higo 2009). En aquest sentit, s'han descrit neurones GABAèrgiques corticals de projecció a l'estriat, l'hipocamp, diferents nuclis del tàlem i l'amígdala, entre d'altres (Melzer and Monyer 2020).

## **6. Dues poblacions neuronals corticals**

Entre la diversitat cel·lular present en el còrtex cerebral, s'ha seleccionat l'estudi de dues poblacions neuronals en base a la seva gran abundància cortical així com per l'àmplia descripció de les seves característiques: neurones amb expressió de colecistocinina (CCK) i neurones amb expressió de parvalbúmina (PVALB) (Whissell et al. 2015; Zeisel et al. 2015; Fuzik et al. 2016). L'àmplia distribució de les neurones CCK, la diversitat de connexions sinàptiques que estableixen i la seva expressió tant en neurones excitatòries com inhibidores, expliquen el gran nombre de funcions que duen a terme tant a nivell fisiològic com patològic en el cervell. Les neurones CCK estan relacionades amb processos de memòria, cognició i ansietat, així com amb els estats patològics de l'esquizofrènia, epilèpsia o atacs de pànic (S. Y. Lee and Soltesz 2011; Whissell et al. 2019; X. Chen et al. 2019; Noble and Roques 2006). Per contra, les interneurons PVALB estan implicades en diferents funcions fisiològiques com són la regulació de la plasticitat i l'aprenentatge, l'associació de la por o el reconeixement de la novetat (Donato, Rompani, and Caroni 2013; Letzkus et al. 2011; Bissonette et al. 2014). Així mateix, alteracions en la inhibició neuronal duta a terme per les interneurons PVALB també es relacionen amb malalties psicològiques i neuronals com l' epilèpsia, l'esquizofrènia, la depressió, l'autisme i la malaltia d'Alzheimer (Marín 2012; X. Jiang, Lachance, and Rossignol 2016).

### 6.1. Neurones corticals amb expressió de colecistocinina

Originalment, la CCK va ser descrita al 1928 com una hormona gastrointestinal sadolladora relacionada amb la contracció de la vesícula biliar i la secreció d'enzims pancreàtics (Ivy and Oldberg 1928; Harper and Raper 1943; Crespo et al. 2009). Més endavant, es va detectar una gran expressió de CCK com a neuropèptid en el SNC, la qual està regulada temporalment en diferents àrees cerebrals durant el desenvolupament (Taula 6). Concretament, en el còrtex cerebral de ratolins es detecta el mRNA de *Cck* a partir d'E17,5 (Giacobini and Wray 2008).

**Taula 6. Patró d'expressió embrionari del transcrit de *Cck* en el sistema nerviós central de ratolí detectat per d'hibridació *in situ*.** Informació adaptada de Giacobini & Wray, 2008.

Àrea cerebral	E12,5	E13,5	E14,5	E17,5
Amígdala anterior			+	+
Cerebel (cèl·lules de Purkinje)				+
Còrtex				+
Còrtex cingulat				+
Gangli del trigemin	+	+	+	+
Hipocamp				+
Hipòfisi	+	+	+	+
Medul·la espinal	+	+	+	+
Metencèfal	+	+	+	+
Nucli paraventricular				+
Nucli vestibular				+
Nuclis subtalàmics			+	+
Tàlem			+	+

En el cervell de ratolins adults, CCK és un dels neuropèptids més abundants i amb una distribució més àmplia. En particular, l'àrea amb més expressió és el còrtex cerebral, tot i que també està present en d'altres zones incloent el BO, el tàlem, l'hipocamp i el cerebel (cèl·lules de Purkinje) (Figura 10A) (Beinfeld et al. 1981; Lein et al. 2007; Taniguchi et al. 2011). En el còrtex cerebral, el patró d'expressió de *Cck* en interneurons o neurones piramidals varia en funció de la capa cortical. En les capes corticals superiors (capa 1) del cervell de ratolins adults, es detecta una co-

localització del 65% de neurones positives per CCK amb el marcador d'interneurones GAD67. Contràriament, en les capes corticals profundes (capes 5/6), la proporció del marcatge de CCK en interneurones és menor, sent més present en neurones piramidals que projecten al tàlem i l'estriat (Calvigioni et al. 2017; Morino et al. 1994). A més a més, en el còrtex S1 un subgrup de neurones CCK piramidals de la capa 5 estenen els axons de manera directa a la medulla espinal (Frezel et al. 2020).

Tot i que durant el desenvolupament l'inici en l'expressió de *Cck* varia significativament entre els subtipus d'interneurones, aquesta és irreversible una vegada les interneurones han abandonat la zona de proliferació de l'eminència gangliònica caudal (Calvigioni et al. 2017). A més a més, les interneurones presenten nivells d'expressió del mRNA de *Cck* superiors en comparació a les neurones excitatòries (Fuzik et al. 2016). La població d'interneurones positives per CCK representen al voltant del 20% de les neurones inhibidores del còrtex (Whissell et al., 2015).

Paral·lelament, mitjançant la seqüenciació individual del transcriptoma per *single cell* RNA-Seq d'interneurones *Cck* de capes corticals superiors (2/3) del S1 es detecta coexpressió d'altres neuropèptids (*Vip*, *Nyp* i *Crh*) i del receptor de cannabinoides tipus 1 (*Cnr1*) però no de parvalbúmina (*Pvalb*) (Fuzik et al. 2016). Per contra, les neurones piramidals *Cck* del S1 presenten un patró d'expressió oposat a les interneurones (*Vip*<sup>-</sup>, *Nyp*<sup>-</sup> i *Crh*) amb marcadors específics de capes corticals (*Calb1* en capes superiors i *Pcp4* en capes profundes).

### **6.1.1. Ratolins model relacionats amb la colecistocinina**

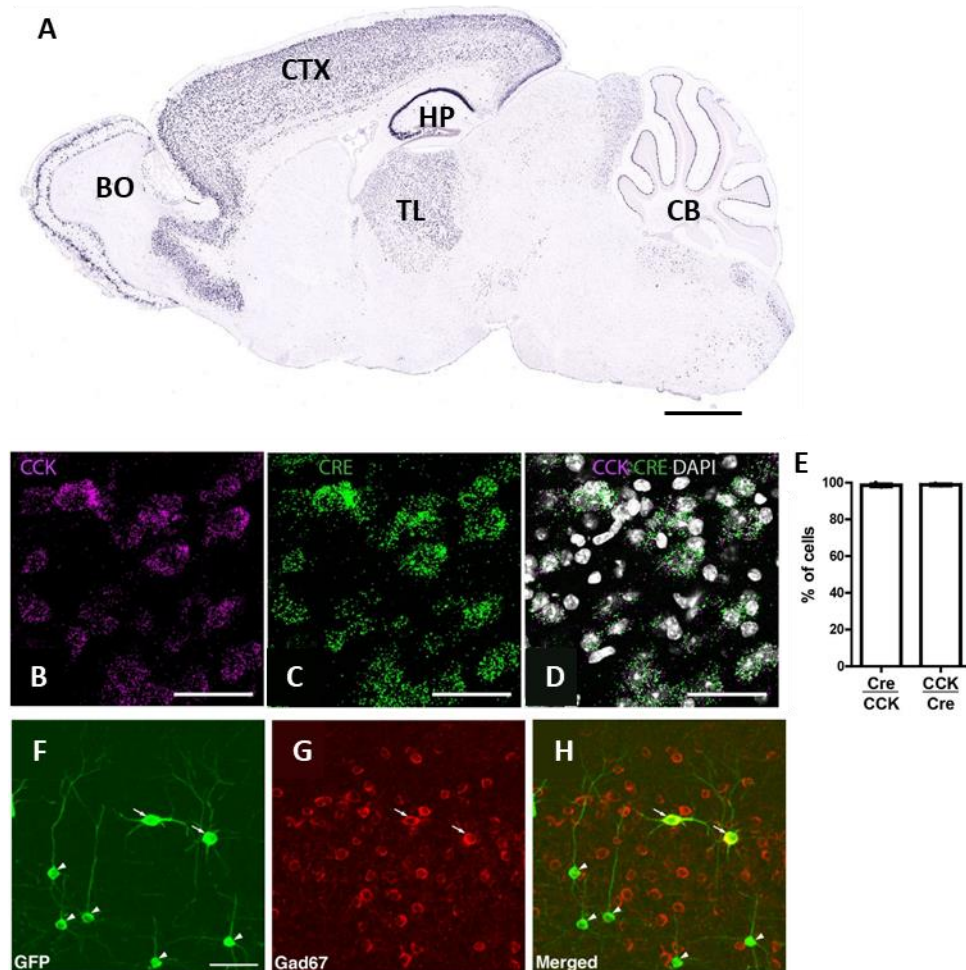
Una de les millors estratègies per estudiar de manera específica les diferents poblacions neuronals corticals consisteix en la modificació gènica. En aquest sentit, Taniguchi et al., 2011 van desenvolupar un ratolí model on l'activitat de la recombinasa Cre està regulada de manera precisa per l'expressió endògena del gen



## Introducció

*Cck* (ratolí CCK-IRES-Cre). La seqüència IRES (lloc intern d'entrada del ribosoma) permet l'inici de la traducció proteica d'un mRNA amb absència de modificacions Cap en el seu extrem 5' (X. Wang and Marchisio 2021) i així sintetitzar la proteïna CRE amb independència de la proteïna CCK. En talls cerebrals de ratolins CCK-IRES-Cre, l'expressió cortical de *Cck* colocalitza quasi en un 99% de les cèl·lules amb expressió de *Cre* detectat per mitjà d'hibridació *in situ* (Figura 10B-E) (Frezel et al. 2020) i a més està present tant en neurones piramidals com interneurons (Figura 10F-H) (Taniguchi et al. 2011). Els ratolins CCK-IRES-Cre han estat utilitzats en diferents estudis corticals per identificar la distribució, l'electrofisiologia i la connectivitat específica de les interneurons CCK en el còrtex prefrontal (R. Nguyen et al. 2020), o bé per determinar la presència de neurones CCK positives en la capa cortical 5 que projecten directament a la medulla espinal (Frezel et al. 2020).

Un altre punt a destacar és l'existència d'un ratolí model amb deficiència constitutiva de CCK (CCK-KO), el qual és viable i fèrtil, tot i la gran presència de CCK en el SNC (Lacourse et al. 1999), per bé que exhibeixen un increment en el comportament d'ansietat i alteracions en la memòria espacial (Lo et al. 2008).



**Figura 10. Patró d'expressió del neuropeptid *Cck* en el sistema nerviós central. A)** Hibridació *in situ* en tall sagital de cervell de ratolí adult (P56) mostrant una gran expressió de *Cck* en el còrtex cerebral (CTX), hipocamp (HP), tàlem (TL), bulb olfactiu (BO) i cerebel (CB). Imatge modificada de l'*Allen Mouse Brain Atlas* (Lein et al. 2007). **B-D)** Hibridació in situ doble demostra el solapament entre l'expressió del mRNA de *Cck* (B) i *Cre* (C) en el còrtex de ratolins CCK-IRES-Cre. Nuclis marcats amb DAPI (D). **E)** Quantificació de B i C on el  $98,6 \pm 1,2\%$  de neurones CCK positives colocalitzen amb Cre i el  $98,8 \pm 0,7\%$  de neurones Cre positives també ho són per CCK (n= 3 ratolins; 1087 neurones). Imatge modificada de Frezel et al. 2020. **F-H)** Expressió de *Cck* (F) en neurones piramidals (punta de fletxa) i interneurons (G, fletxa) en el còrtex de ratolins CCK-CreER::RCE-LoxP induït amb tamoxifèn en edat adulta per tal d'expressar el marcador GFP en la població neuronal CCK amb especificitat temporal. Imatge modificada de Taniguchi et al. 2011. Escala (A) = 1,5 mm; escala (B, F) = 50  $\mu$ m.

## 6.2. Neurones corticals amb expressió de parvalbúmina

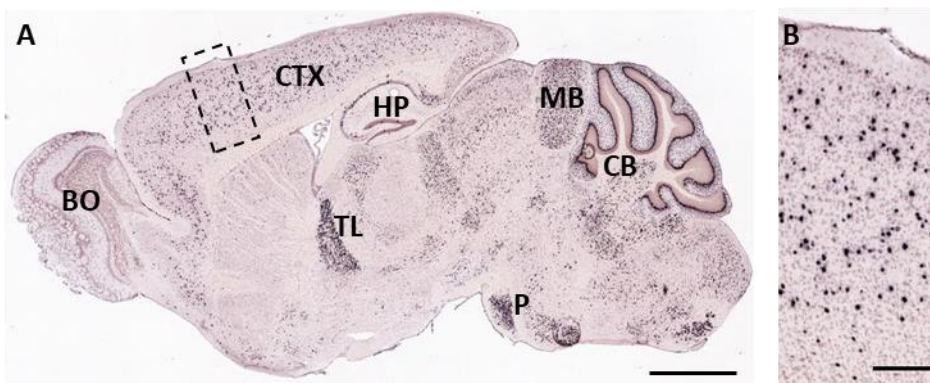
PVALB és una proteïna d'unió al calci descrita inicialment en el teixit muscular que més endavant també va ser detectada àmpliament en diferents poblacions neuronals del SNC (M. R. Celio and Heizmann 1981; Hamoir and Konosu 1965). Durant el desenvolupament, PVALB es detecta en el còrtex de ratolins a partir de P10 i no és fins a P21 que ja presenta un patró d'expressió semblant al descrit en el còrtex d'animals adults (Lecea, del Río, and Soriano 1995). La síntesi de PVALB s'inicia en la capa cortical 5, expandint-se posteriorment per les capes 2-6 (del Rio et al. 1994). En d'altres zones cerebrals, tals com el cerebel, es detecta PVALB a partir de P15 (Endo, Kobayashi, and Onaya 1985).

En el ratolí adult, la proteïna PVALB es sintetitza de manera extensa en diferents àrees cerebrals: BO, còrtex, hipocamp, nuclis reticulars del tàlem, hipotàlem, nuclis vestibulars, nuclis olivars superiors dels nuclis pontins, cerebel i medul·la espinal (Figura 11A) (Endo et al. 1986; M. R. Celio and Heizmann 1981). En el còrtex cerebral i l'hipocamp, l'expressió de *Pvalb* està restringida a les interneurons (Marco R. Celio 1986), mentre que en d'altres àrees cerebrals tals com l'hipotàlem lateral també es detecta la seva presència en neurones glutamatèrgiques (Siemian, Sarsfield, and Aponte 2020). En funció de l'àrea cortical analitzada, la proporció de neurones GABAèrgiques amb expressió de PVALB varia del 10-40%, sent més abundants en el còrtex parietal i occipital (Figura 11B) (Whissell et al., 2015).

Les interneurons PVALB exhibeixen una morfologia multipolar ramificada, pel que s'anomenen *basket cells* (Klausberger and Somogyi 2008), amb múltiples dendrites presents en diferents capes, la qual cosa els permet rebre estímuls de diverses vies (Kubota et al. 2011), així com axons molt ramificats per tal d'establir connexions inhibidores amb un gran nombre de neurones post-sinàptiques en la zona perisomàtica (Karube, Kubota, and Kawaguchi 2004). Degut a la seva característica resposta ràpida (*fast-spiking*), les interneurons PVALB tenen la capacitat de modificar l'oscil·lació neuronal del còrtex de manera ràpida i precisa. En qüestió de

milisegons poden convertir un estímul entrant excitatori en inhibitori (Hu, Gan, and Jonas 2014; Bartos, Vida, and Jonas 2007).

Un subgrup de neurones GABAèrgiques amb expressió de *Pvalb* presenten projeccions de llarg abast, ja que mostren connexions contralaterals inhibidores en el còrtex motor, visual i auditiu a través del cos callós en ratolins (Rock et al. 2018; A. T. Lee et al. 2014; Jinno and Kosaka 2004). Tot i així, s'ha de tenir en compte que la gran majoria de cèl·lules amb PVALB són interneurons que modulen l'activitat de les neurones piramidals de manera local (Xiaolong Jiang et al. 2015).



**Figura 11. Patró d'expressió del transcrit de *Pvalb* en el sistema nerviós central.** **A)** Hibridació *in situ* en tall sagital de cervell de ratolí adult (P56) que mostra l'expressió de *Pvalb* en el bulb olfactiu (BO), còrtex cerebral (CTX), hipocamp (HP), nuclis reticulars del tàlem (TL), colícul inferior en el mesencèfal (MB), cerebel (CB) i nuclis pontins (P). Imatge modificada de l'*Allen Mouse Brain Atlas* (Lein et al. 2007). **B)** Expressió de *Pvalb* en el còrtex. Magnificació del requadre puntejat del panell A. Escala (A) = 1,6 mm; escala (B) = 300µm.

### 6.2.1. Ratolins model relacionats amb la parvalbúmina

Per tal de generar modificacions genètiques de manera específica en les neurones positives per PVALB, es va generar un ratolí model amb expressió de la recombinasa Cre sota el promotor endogen del gen *Pvalb* (ratolí Pvalb-IRES-Cre) (Hippenmeyer et al. 2005). En els ratolins Pvalb-IRES-Cre, l'expressió de la recombinasa Cre s'ha detectat en més d'un 90% de les neurones PVALB, les quals presenten alts nivells d'expressió de la proteïna d'unió al calci (Madisen et al. 2010; Runyan et al. 2010). Aquest model animal ha estat validat i utilitzat àmpliament en més de 500

## Introducció

publicacions, per exemple per determinar el paper de *Pvalb* i la seva expressió en l'esquizofrènia (Curley et al. 2013), el processament de senyals lluminoses a la retina (Tikidji-Hamburyan et al. 2015) o bé la mielinització en interneurons PVALB (Stedehouder et al. 2017). Cal destacar l'existència d'altres models de ratolins amb expressió de Cre en neurones PVALB seguint estratègies genètiques alternatives: ratolins *Pvlab-2A-Cre*, per tal de reproduir l'expressió de la recombinasa de manera més fidedigne als nivells endògens de PVALB (Madisen et al. 2010), o bé ratolins *PV-CreER*, per tal d'induir l'expressió de Cre amb tamoxifèn (Taniguchi et al. 2011).

Paral·lelament, la creació de ratolins deficients per PVALB (*PvalbKO*) va posar de manifest que eren fèrtils i viables amb un pes corporal semblant als ratolins *wild type* (Schwaller et al. 1999). Aquests animals mostren un augment en l'activitat locomotora i sense diferències en la coordinació motora en comparació als animals control (Farré-Castany et al. 2007). No obstant, manifesten una conducta associada a l'autisme, ja que presenten alteracions en la comunicació i les interaccions socials, així com comportaments repetitius i estereotipats (Wöhr et al. 2015).

# Hipòtesi i objectius

---



La hipòtesi de treball es basa en considerar que el dany cortical observat a la SL està causat per l'afectació diferencial de la disfunció mitocondrial en diferents poblacions neuronals corticals, donant lloc a les alteracions funcionals i conductuals relacionades amb la SL. Per tal de corroborar aquesta hipòtesi ens plantegem els següents objectius específics:

- 1.** Determinar la implicació del còrtex cerebral en el desenvolupament de la SL en un model de ratolí amb deficiència condicional de la subunitat mitocondrial NDUFS4 en la població neuronal CCK. Amb aquest propòsit, s'analitzaran diferents paràmetres conductuals i fisiològics alhora que l'histopatologia neuronal de manera progressiva.
- 2.** Analitzar els canvis traduccionals derivats de la disfunció mitocondrial en neurones CCK en el context de la SL amb especificitat neuronal.
- 3.** Determinar la implicació del còrtex cerebral en el desenvolupament de la SL en un model de ratolí amb deficiència condicional de la subunitat mitocondrial NDUFS4 en la població neuronal PVALB. Amb aquest propòsit, s'analitzaran diferents paràmetres conductuals i fisiològics alhora que l'histopatologia neuronal de manera progressiva.





# **Material i mètodes**

---



## 1. Animals

En aquest estudi es van emprar ratolins (*Mus musculus*) amb un fons genètic C57BL/6J (resultant de més de vint retrocreuaments amb individus d'aquesta soca). Ratolins femelles i mascles es van repartir de manera equitativa entre els diferents grups d'estudi. Les condicions d'establació es van mantenir a una temperatura constant de 22°C, humitat relativa de 55±10%, cicle de llum/fosc de 12 hores i accés a aigua i menjar (2014 diet, HSD Tekland Inc) *ad libitum*. Tots els animals es van sacrificar per asfíxia amb CO<sub>2</sub>. Els procediments realitzats van ser prèviament avaluats, aprovats i autoritzats per la Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona i la Generalitat de Catalunya. Seguint aquestes guies es van tenir en compte anomalies com maloclusió dental o dermatitis ulcerativa, relacionada amb l'envelliment, per tal de procedir a l'eutanàsia per asfíxia amb CO<sub>2</sub>. En la Taula 7 es detallen totes les soques de ratolins utilitzades per obtenir els diferents animals controls i mutats.

**Taula 7. Llistat de soques de ratolins utilitzades en aquesta tesi doctoral.** Els ratolins van ser obtinguts de *The Jackson Laboratory (JAX)*, a excepció del ratolí *Pvalb<sup>Cre/+</sup>* que va ser cedit pel Dr. Carles Saura (originalment de JAX). MGI: *Mouse genome informatics*.

Identificació	Referència	Soca
<i>Ndufs4<sup>Δ/+</sup></i> ( <i>Ndufs4KO</i> )	(Kruse et al. 2008) MGI: 5614215	B6.129S4-Ndufs4tm1.1Rpa/J (JAX stock #027058)
<i>Ndufs4<sup>lox/lox</sup></i>	(Kruse et al. 2008) MGI: 5613135	B6.129S4-Ndufs4tm1Rpa/J (JAX stock #026963)
<i>Rpl22<sup>HA/HA</sup></i> (RiboTag)	(Sanz et al. 2009) MGI: 4355967	B6N.129-Rpl22tm1.1Psam/J (JAX stock #011029)
<i>Cck<sup>Cre/+</sup></i> ( <i>Cck-IRES-Cre</i> )	(Taniguchi et al. 2011) MGI: 5014096	Ccktm1.1(cre)Zjh/J (JAX stock #012706)
<i>Pvalb<sup>Cre/+</sup></i> ( <i>Pvalb-IRES-Cre</i> )	(Hippenmeyer et al. 2005) MGI: 3590684	B6;129P2-Pvalb1(cre)Arbr/J (JAX stock #017320)

Δ = al·lel deletat

### 1.1 Extracció de DNA genòmic

El DNA genòmic dels ratolins es va extreure a partir d'una mostra de cua de 3-5mm obtinguda en el moment del deslletament (P21) amb el kit comercial *HigherPurity™*

## Material i mètodes

*Blood & Cell Culture DNA Extraction Mini Spin Kit* (#AN0045-XL, Canvax) tot seguint el protocol descrit pel fabricant. Breument, cada mostra va ser digerida amb proteïnasa K i tampó de digestió durant tota la nit a 56°C. L'endemà, es va afegir etanol 100%, es va traspasar tot el contingut a una columna d'extracció i es va centrifugar a 8000 rpm durant 1 minut. Seguidament, es van fer una sèrie de rentats i centrifugacions amb 2 tampons de rentat. Es va realitzar una última centrifugació a màxima velocitat durant 3 minuts per assecar la columna. Per acabar, es va eluir la mostra amb 80 µL de tampó d'elució.

### 1.2 Genotipatge dels ratolins transgènics

El genotipatge per *Cre* recombinasa es va dur a terme mitjançant PCR quantitativa (qPCR) a partir d'1µL del DNA genòmic extret, segons la Taula 8. Una vegada preparada la reacció de genotipatge, la seqüència diana va ser amplificada seguint el següent perfil tèrmic en l'equip *AriaMx Real-time PCR System* (Agilent): 95°C, 2 min; [95°C, 30s; 56°C, 1min] 40 cicles. Només les mostres amb presència del gen *Cre* van presentar amplificació de la seqüència.

**Taula 8. Reactius utilitzats per dur a terme el genotipatge del gen *Cre* mitjançant qPCR.** FOR: Forward, REV: Reverse.

Reactiu	Volum (µL)	Referència (casa comercial/seqüència)
10x DreamTaq buffer	0,9	#11856863 (ThermoFisher Scientific)
dNTPs (5mM)	0,36	#R0192 (ThermoFisher Scientific)
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,26	#R0971 (ThermoFisher Scientific)
DreamTaq Polymerase	0,1	#EP0702 (ThermoFisher Scientific)
<i>Primer Cre_FOR</i> (10µM)	0,1	5'-CTGCCACCAGCCAGCTAT-3'
<i>Primer Cre_REV</i> (10µM)	0,1	5'-GGGCACTGTGTCCAGACC-3'
qPCR Probe <i>Cre</i> (10µM)	0,1	5'-CCCTGGAAGGGATTTTGAAGCAA-3'
H <sub>2</sub> O	6,08	
DNA genòmic	1	
Volum final	10	

En quant al genotipatge dels al·lels *Ndufs4* i *Rpl22* es va dur a terme per PCR directa a partir d'1 µL de mostra de DNA genòmic amb la reacció *Phire Tissue Direct PCR Master Mix* (#15481124, Thermo Scientific). Els reactius utilitzats estan detallats en la Taula 9, mentre que les seqüències dels *primers* (encebadors) i els perfils tèrmics utilitzats en cada PCR s'indiquen a la Taula 10.

**Taula 9. Reactius utilitzats per dur a terme el genotipatge dels al·lels *Ndufs4* i *Rpl22* mitjançant PCR.** S'utilitzen 3 *primers* pel genotipatge de l'al·lel *Ndufs4* i 2 *primers* per l'al·lel *Rpl22*.

Reactiu	Volum (µL)
<i>Phire Tissue Direct PCR Master Mix</i> (2X)	10
<i>Primers</i> (10µM) (cadascun)	1
H <sub>2</sub> O	7 (per 2 <i>primers</i> ) 6 (per 3 <i>primers</i> )
DNA genòmic	1
Volum final	20

**Taula 10. Seqüències dels *primers* utilitzats pel genotipatge dels al·lels *Ndufs4* i *Rpl22* així com el corresponent programa de PCR emprat.** FOR: *Forward*, REV: *Reverse*.

Nom del <i>primer</i>	Seqüència	Programa PCR
Ndufs4_1060	5'-AGCCTGTTCTCATACCTCGG-3'	98°C 1 min 98°C 5 s 55°C 15 s 72°C 30 s 72°C 5 min 4°C ∞
Ndufs4_1061	5'-GTCCTCTATGAGGGTACAGAG-3'	
Ndufs4_1139	5'-GGTGCATACTTATACTACTAGTAG-3'	
Rpl22HA_REV	5'-TTTCCAGACACAGGCTAAGTACAC-3'	95°C 2 min 95°C 20 s 57°C 20 s 72°C 30 s 72°C 5 min 4°C ∞
Rpl22HA_FOR	5'-GGGAGGCTTGCTGGATATG-3'	

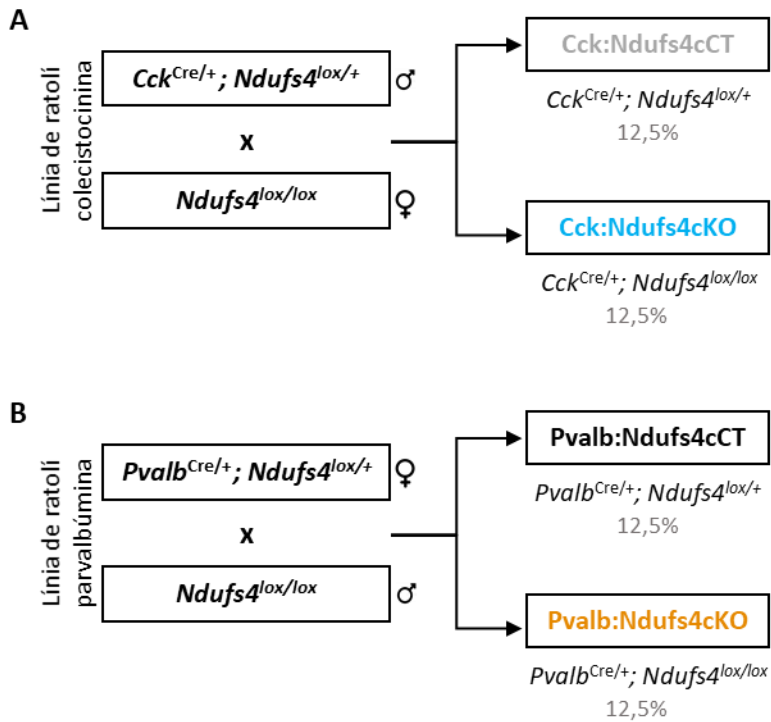
Els productes amplificats en les reaccions de PCR pels al·lels *Ndufs4* i *Rpl22* es van separar mitjançant electroforesi en gel d'acrilamida amb un 10% d'una barreja d'acrilamida/bisacrilamida (37,5:1; #100638, Merck Millipore), 0,5X TBE (#BP-1333-4, Fisher Scientific), un 0,75% de solució d'APS al 10% pes/volum (#10744171, Fisher Scientific) i un 0,15% de TEMED (#1107320100, Merck Millipore), en solució aquosa.

## Material i mètodes

Posteriorment es van tenyir amb el colorant de DNA *Midori Green* (#B4MG04, Cultek) i visualitzats amb llum ultravioleta. En el genotipatge de l'al·lel *Ndufs4* es van obtenir productes de 300 pb ( $\Delta$ ), 200 bp (lox) o bé 150 bp (*wild type*), mentre que pel gen *Rpl22* es van obtenir productes de 290 pb (HA) o bé 242 pb (*wild type*).

### **1.3 Generació de ratolins transgènics amb deleció condicional del gen *Ndufs4* en neurones CCK o PVALB**

Es va seguir la mateixa estratègia d'encreuaments per tal d'obtenir els ratolins amb deficiència de la subunitat mitocondrial NDUFS4 restringida a neurones CCK o PVALB mitjançant el sistema Cre-loxP (Gu, Zou, and Rajewsky 1993; H. Kim et al. 2018). Aquests ratolins expressen la recombinasa Cre sota el promotor endogen del gen *Cck* o bé del gen *Pvalb*. Tal i com es descriu a la Figura 12, amb aquesta estratègia obtenim un grup deficient per *Ndufs4* només en les neurones CCK o bé PVALB (Cck:Ndufs4cKO; Pvalb:Ndufs4cKO). Pel contrari, el grup control (Cck:Ndufs4cCT; Pvalb:Ndufs4cCT) són heterozigots per l'al·lel deletionat *Ndufs4*, ja que s'ha descrit que no presenten cap fenotip patològic i són comparables a animals amb dos al·lells funcionals (*wild type*) del gen *Ndufs4* (Kruse et al. 2008).



**Figura 12. Estratègia d'encreuaments dels animals experimentals. A, B)** Generació de ratolins amb delecció condicional del gen *Ndufs4* en neurones CCK (*Cck:Ndufs4cKO*) (A) o en neurones PVALB (*Pvalb:Ndufs4cKO*) (B) i els seus respectius controls (*Cck:Ndufs4cCT* i *Pvalb:Ndufs4cCT*).

#### 1.4 Generació de ratolins transgènics amb marcatge específic dels ribosomes citosòlics en les neurones CCK

Per tal d'estudiar el traductoma citosòlic de les neurones CCK del còrtex en el context de la malaltia mitocondrial es va generar una nova línia d'animals transgènics que permet el marcatge ribosomal específicament en aquestes neurones (Figura 13). Gràcies a la tecnologia Cre-loxP, es van creuar ratolins que expressen la recombinasa Cre sota el promotor endogen del gen *Cck* amb ratolins de la línia RiboTag. Aquests ratolins presenten el gen ribosomal *Rpl22* floxat de tal manera que només en la presència de la recombinasa Cre s'expressa l'epítip d'hemaglutinina (*Rpl22·HA*), tot marcant específicament els ribosomes de les neurones CCK i permetent la seva posterior immunoprecipitació i l'anàlisi dels transcrits associats (traductoma).



## Material i mètodes

Finalment, es van creuar amb animals amb el gen *Ndufs4* floxat per tal d'obtenir els animals *Cck:RiboTag:Ndufs4cKO*, que presenten deficiència mitocondrial en les neurones CCK i animals control *Cck:RiboTag:Ndufs4cCT*, que mantenen un al·lel *Ndufs4 wild type*.

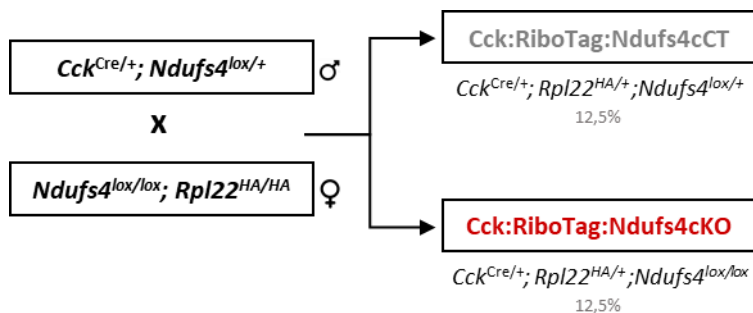


Figura 13. Generació dels ratolins *Cck:RiboTag:Ndufs4cKO* i control (*Cck:RiboTag:Ndufs4cCT*) amb deficiència mitocondrial en les neurones CCK i marcatge HA de la subunitat ribosomal citosòlica RPL22 (RiboTag).

## 2. Ressonància magnètica

Les imatges RM van ser obtingudes al Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona amb un aparell BioSpec7T 70/30USR (Bruker), sota la supervisió i suport tècnic de la Dra. Silvia Lope. L'anàlisi i interpretació de les dades obtingudes es va realitzar posteriorment tal i com es descriu a continuació en detall per a cada determinació. Les imatges de RM dels ratolins *Cck:Ndufs4cKO* i *Cck:Ndufs4cCT* es van obtenir als 3, 6, 9 i 12 mesos d'edat. En cada edat es van analitzar 3-4 animals per cada grup d'estudi.

Els ratolins van ser anestesiats amb isoflurà al 4% per a la inducció i mantinguts amb isoflurà a l'1,5% en O<sub>2</sub> a 1L/min mitjançant un vaporitzador nasal. Després de fixar la posició del cap mitjançant dues barres laterals a l'alçada de les orelles i el tub nasal a la zona frontal, els ratolins es van introduir horitzontalment a l'aparell de ressonància sobre un llit amb circuit d'aigua calenta a 37°C. Durant les 2h de cada sessió, es va monitoritzar la temperatura corporal (37°C ± 0,5°C) i la respiració (50-

80 bpm). Les dades es van obtenir i processar en un ordinador Linux amb el programa Paravision 5.1.

Es van generar diferents anàlisis de ressonància: imatges ponderades en T2 (T2w), imatges ponderades en T2\* (T2\*w), mapes de T2, imatges de tensor de difusió (DTI) amb mapes de coeficient de difusió aparent (ADC) i perfusió amb mapes de flux sanguini cerebral relatiu (rCBF) (Taula 11), el detall dels quals es descriuen a continuació.

**Taula 11. Anàlisi de ressonància magnètica emprats en ratolins Cck:Ndufs4cKO i Cck:Ndufs4cCT de diferents edats juntament amb la informació que aporten.** (Filippi and Agosta 2016; Guzmán-De-Villoria, Fernández-García, and Ferreiro-Argüelles 2010; Yousaf, Dervenoulas, and Politis 2018)

Tècnica de RM	Abreviació	Informació aportada
Ponderada en T2	T2w	Imatges qualitatives per detectar visualment lesions tissulars corresponents a isquèmia, tumor, infecció o inflamació
Mapes de T2		Quantificació numèrica de T2w
Ponderada en T2*	T2*w	Imatges qualitatives per detectar visualment la presència d'hemorràgies
Mapes de coeficient de difusió aparent	Mapes d'ADC	Imatges qualitatives i quantitatives per avaluar la difusió de l'aigua, permet detectar edemes
Mapes de flux sanguini cerebral relatiu	rCBF	Imatges qualitatives i quantitatives per avaluar el flux sanguini

## 2.1 Anàlisi de l'anatomia cerebral

El volum dels ventricles, el volum de l'àrea lesionada i el gruix del còrtex van ser calculats amb el programa ImageJ (versió 1.52p) a partir de les imatges de T2w. Primerament, es va delimitar manualment l'àrea dels ventricles en cada secció analitzada (0,74mm fins -2,30 mm segons Bregma). Seguidament, en aquelles seccions on el còrtex presentava uns valors de T2w similars als ventricles en l'escala de color *Spectrum*, se'n va calcular el volum i es va considerar zona afectada (Figura 14A). El valor obtingut en píxels en els dos casos va ser multiplicat pel volum del vòxel (0,075 x 0,075 x 0,5 mm<sup>3</sup>). Es va representar el volum total dels ventricles laterals (LV) dels dos hemisferis i del tercer ventricle dorsal (D3V). Per altra banda,

## Material i mètodes

manualment es va traçar una línia en vertical entre la part més dorsal del còrtex i l'inici del ventricle en les diferents seccions analitzades (0,74mm fins -2,30 mm segons Bregma) (Figura 14B). Posteriorment, es va fer la mitjana de la distància entre els dos hemisferis i es va multiplicar per la mida del píxel (0,075mm).

### **2.2 Relaxometria T2, imatges ponderades en T2 i T2\***

Primerament es van generar imatges de baixa resolució T2w en els plans axial, sagital i coronal per tenir les seccions de referència. Posteriorment, es van generar les imatges de T2w definitives aplicant la seqüència d'adquisició ràpida per increment de la relaxació (RARE) amb els següents paràmetres d'alta resolució: factor RARE 8; temps d'eco efectiu ( $TE_{eff}$ ) 48 ms; temps de repetició (TR) 4,2 s; camp de visió (FOV) 1,92 x 1,92 cm<sup>2</sup>; matriu (MTX) 256 x 256 (75 x 75 μm/píxel); 30 seccions consecutives amb un gruix de 0,5 mm; nombre d'acumulacions (NA) 4 i temps d'experiment ( $Exp_t$ ) 6 min 43 s. Els mapes de T2 es van obtenir amb una seqüència multi-spin multi-eco amb els següents paràmetres: TR 7 s; nombre d'ecos 18; primer TE 10 ms; temps entre ecos 10 ms; FOV 1,92 x 1,92 cm<sup>2</sup>; MTX 128 x 128 i  $Exp_t$  11 min 12 s. Es van adquirir les mateixes seccions ja descrites en les imatges de T2w.

Els mapes de relaxació T2 es van calcular píxel a píxel utilitzant el programa ParaVision 5.1. La quantificació dels mapes T2 es va realitzar delimitant 4 zones d'interès o ROI (*region of interest*) de manera bilateral en cada secció: còrtex parietal, còrtex temporal, estriat i tàlem (Figura 14C, D). Es van quantificar les seccions centrals del cervell començant en la posició 0,74 mm segons Bregma fins a -2,30 mm. Les coordenades Bregma indicades estan basades en Franklin & Paxinos, 2007 (Figura 14E-L). A partir de cada ROI es va obtenir un valor de temps de relaxació T2. La presència d'hemorràgies es va avaluar mitjançant les imatges T2\*w. Es van adquirir utilitzant la mateixa geometria que les imatges T2w però amb una seqüència de gradient d'eco de tir ràpid amb angle baix (FLASH) amb els següents paràmetres: TR 500 ms; TE 8 ms; angle 40°; NA 4 i  $Exp_t$  6min 24 s.

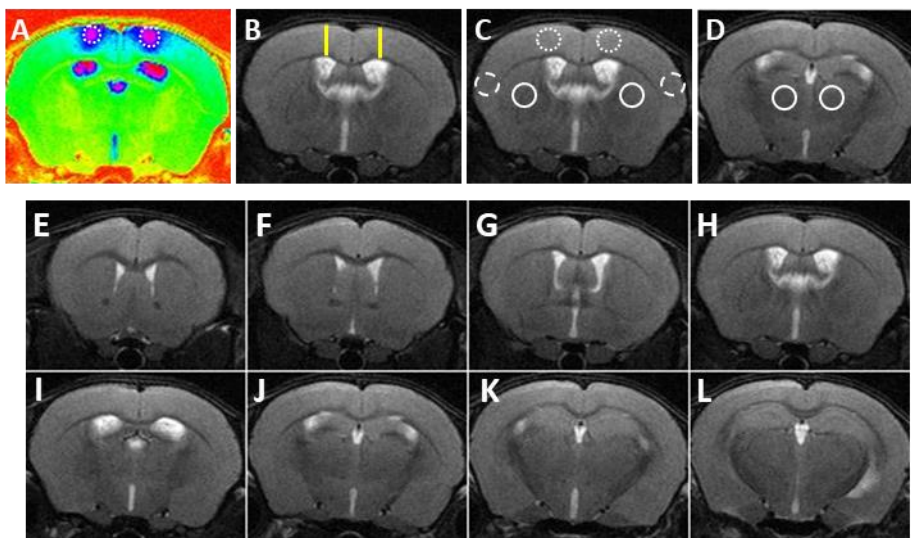
### 2.3 Determinació del tensor de difusió

Les imatges de DTI permeten generar els mapes d'ADC, en els quals es quantifica la difusió de l'aigua en un teixit. Es va aplicar una seqüència de difusió d'imatge eco-planar segmentada utilitzant la sincronització respiratòria per minimitzar artefactes de moviment (4 segments; TR 3,8 s;  $TE_{\text{eff}}$  24 ms; FOV 1,92 x 1,92 cm<sup>2</sup> i MTX 128 x 128). Es van obtenir un total de 15 seccions d'1 mm de gruix amb valors de b 0, 200, 600 i 1000 s/mm<sup>2</sup> en 20 direccions de difusió amb un temps de gradient de difusió ( $\delta$ ) 5 ms; temps entre gradients de difusió ( $\Delta$ ) 10 ms i  $Exp_t$  24 min 4 s. Posteriorment, les imatges ponderades en difusió van ser processades amb el programa ParaVision 5.1 per tal d'obtenir el tensor de difusió del qual s'extreuen les difusivitats principals. El valor final d'ADC generat correspon a la mitjana de les difusivitats principals. En els mapes d'ADC es van establir els mateixos ROI ja descrits pels mapes de T2 en les mateixes seccions (apartat 2.2) (Figura 14C, D). A partir de cada ROI es va obtenir un valor de difusió ADC.

### 2.4 Determinació del flux sanguini (anàlisi de perfusió)

El flux sanguini va ser analitzat per perfusió sense injecció de cap agent extern. La perfusió es basa en la quantificació del flux sanguini que arriba en una zona cerebral concreta gràcies a magnetitzar la sang entrant utilitzant la tècnica de marcatge de l'spin arterial (ASL). Es va realitzar l'anàlisi de perfusió en un sol pla d'1mm de gruix, a partir de Bregma -0.1mm o -0.46mm. Es van aplicar els següents paràmetres d'adquisició: factor RARE 72; TR 16 s;  $TE_{\text{eff}}$  50 ms; 22 temps de recuperació de la inversió entre 30 i 4000 ms; MTX 128 x 128; FOV 1,92 x 1,92 cm<sup>2</sup> i  $Exp_t$  13 min.

Posteriorment, a partir de les imatges ASL es van generar mapes de T1 amb inversió global i selectiva que a la vegada van permetre obtenir els mapes rCBF. Els mapes rCBF van ser quantificats amb els mateixos quatre ROI ja descrits pels mapes de T2 (apartat 2.2) (Figura 14C, D). A partir de cada ROI es va obtenir un valor de rCBF.



**Figura 14.** Anàlisi de les imatges de ressonància magnètica. **A)** Àrea cortical alterada indicada amb cercle de punts discontinus a Bregma  $-0,46\text{mm}$  amb escala de colors *Spectrum*. **B)** Traç representatiu emprat (en groc) per calcular distància cortical. **C,D)** Ubicació representativa dels ROI per quantificar mapes de T2, mapes d'ADC i perfusió. Es van establir 4 zones d'estudi: còrtex parietal (cercle de punts discontinus), còrtex temporal (cercle de ratlles discontinues), estriat (C) (cercle continu) i tàlem (D) (cercle continu). **E-K)** Les 8 seccions cerebrals quantificades dels mapes de T2 i d'ADC amb nomenclatura basada en les coordenades establertes per Franklin & Paxinos, 2007 segons Bregma:  $0,74\text{ mm}$  (E);  $0,38\text{ mm}$  (F);  $-0,10\text{ mm}$  (G);  $-0,46\text{ mm}$  (H);  $-0,82\text{ mm}$  (I);  $-1,06\text{ mm}$  (J);  $-1,70\text{ mm}$  (K) i  $-2,30\text{ mm}$  (L). Tots els panells corresponen a imatges de T2 ponderada.

### 3. Conducta animal

El seguiment del pes corporal dels ratolins es va dur a terme una vegada a la setmana entre els 2-12 mesos d'edat. Aquest seguiment setmanal també va permetre estudiar-ne la supervivència. Cada ratolí va realitzar un màxim de 3 tests conductuals en total, progressius en estrès i en dies alterns. Els tests es van dur a terme una vegada al mes, sempre en la mateixa sala i en horari de matí. Els ratolins que s'utilitzaven per primera vegada en tests conductuals eren habituats prèviament al contacte en sessions de 5 min de manipulació durant una setmana. Els animals es traslladaven amb 1 hora d'antelació a la sala de conducta abans de realitzar cada test. En funció de la tipologia del test conductual es va gravar en vídeo la sessió per analitzar-la posteriorment.

### 3.1 Test del *rotarod*

Es va utilitzar un aparell de *rotarod* (Panlab LE8205) per estudiar la coordinació motora i equilibri dels ratolins (Brooks and Dunnett 2009) (Figura 15A). En aquest test, els animals es col·loquen en un cilindre giratori (30 mm diàmetre) en acceleració i es determina el temps que aconseguen mantenir-s'hi. Una setmana abans del test, els animals van ser habituats a l'activitat durant 3 dies consecutius i 3 sessions cada dia: els dos primers dies sense acceleració i l'últim dia amb acceleració de 4 a 40 rpm amb un increment de 2 rpm cada 10 segons, amb un temps màxim de 3 minuts. El dia del test, cada animal va realitzar 5 sessions separades per 8 minuts de descans amb una acceleració de 4 a 40 rpm amb un increment de 2 rpm cada 10 segons. Es va comptabilitzar el temps que el ratolí aconseguia mantenir-se en rotació i la velocitat del cilindre en el moment de caure. Si un ratolí es mantenia al cilindre al final de la sessió es comptabilitzava com a 180 segons. Es va calcular la mitjana de les 5 sessions.

### 3.2 Test del llistó vertical

El test del llistó vertical permet mesurar la coordinació motora i equilibri dels ratolins (Brooks and Dunnett 2009) (Figura 15B). Un pal metàl·lic (60 cm llargada i 1 cm diàmetre) es va ubicar verticalment en una superfície. Els ratolins van ser col·locats a l'extrem superior del pal mirant avall i es va mesurar el temps que trigaven a descendir fins a la superfície, determinant un temps màxim de 60 segons per realitzar la tasca. Aquells animals que queien del pal, també se'ls va aplicar un temps de 60 segons. Una setmana abans del test, es van habitar els animals en 3 sessions consecutives separades per 20 minuts d'espera. El dia del test, cada animal va realitzar 3 sessions consecutives amb 20 minuts d'espera entre sessió. Posteriorment, es va calcular la mitjana del temps de les 3 sessions.

### 3.3 Conducta de *claspig*

Els ratolins adults quan són suspesos per la cua tendeixen a obrir les quatre extremitats enfora com a anticipació del contacte amb una superfície. Pel contrari, els ratolins amb afectacions en diferents àrees cerebrals, tals com cerebel, ganglis basals, còrtex o medul·la espinal, flexionen les extremitats cap a l'abdomen (*claspig*) (Lalonde and Strazielle 2011). Els ratolins van ser suspesos per la cua durant 30 segons i el comportament va ser enregistrat en vídeo. Es va determinar la presència (sí/no), la durada (segons) i la severitat del *claspig* en les extremitats posteriors (puntuació detallada en Taula 12) de cada animal una vegada al mes. Aquest test no va precisar una habituació prèvia.

**Taula 12. Descripció de la puntuació aplicada en la conducta de *claspig*.**

Puntuació	Conducta
0	Extremitats posteriors obertes i lluny de l'abdomen
1	Una de les extremitats posteriors flexionada cap a l'abdomen el 50% o més del temps d'observació
2	Les dues extremitats posteriors parcialment flexionades cap a l'abdomen el 50% o més del temps d'observació
3	Les dues extremitats posteriors completament flexionades cap a l'abdomen el 50% o més del temps d'observació

### 3.4 Test del laberint en "Y"

El test del laberint en "Y" (*Y maze*) es basa en la tendència natural dels ratolins d'explorar un ambient nou i permet mesurar les alternacions espontànies (Mandillo et al. 2008) (Figura 15C). Aquest test consisteix en una estructura en forma de Y amb 3 braços iguals connectats. Es va col·locar el ratolí en el centre dels 3 braços i es va registrar la seva activitat durant 5 minuts amb una càmera ubicada en el sostre. Posteriorment, es va anotar la seqüència d'entrades de cada animal. Només quan tot el cos de l'animal estava completament dins d'un dels braços es va registrar com a entrada. Aquells animals que van fer menys de 5 entrades van ser descartats dels anàlisis. La conducta esperada dels ratolins implica que explorin aquell braç que fa més temps que no visiten. Per tant, es considera una alternança exitosa quan el ratolí

fa 3 entrades consecutives en braços diferents. Es van quantificar les entrades totals en els braços del laberint i el percentatge d'alternança ( $[\text{alternança exitosa} / \text{entrades totals} - 2] \times 100$ ).

### 3.5 Test d'intrusió de ratolí desconegut

Per tal d'analitzar el comportament d'agressió, violència i estrès social en els ratolins mascles es va realitzar el test d'intrusió de ratolí desconegut (*resident intruder*) (Figura 15D). Per a dur a terme aquest test es va aïllar en la seva gàbia el ratolí d'estudi durant els 15 dies previs al test sense canviar-ne les serradures. D'aquesta manera, en la gàbia només hi havia olors del ratolí d'estudi. El test consisteix en introduir un ratolí desconegut o intrús en la gàbia del ratolí d'estudi durant 10 minuts i permetre la interacció directe sense impediments entre els dos animals. Es va enregistrar la conducta en vídeo gràcies a una càmera ubicada al sostre. Es va utilitzar un animal intrús no vist prèviament i d'edat semblant per aquell ratolí d'estudi. A partir del visionat de les imatges, es va comptabilitzar el temps de conducta agressiva (ratolí d'estudi ataca ratolí intrús) i l'exploració social (ratolí estudi olora ratolí intrús) calculant la mitjana dels paràmetres dels diferents animals.

### 3.6 Test de camp obert

El test de conducta de camp obert (*open field*) consisteix en ubicar un ratolí en el centre d'una caixa durant un temps determinat i analitzar-ne l'activitat (Figura 15E). Aquest test permet estudiar l'activitat i la locomoció voluntària dels ratolins, així com la conducta emocional de l'ansietat (Bronikowski et al. 2001; Seibenhener and Wooten 2015). Es va utilitzar una caixa blanca de metacrilat sense tapa de 56 x 36,5 x 31 cm d'àrea. Cada ratolí es va moure lliurement per la caixa durant 30 minuts i tota l'activitat va ser enregistrada amb vídeo amb una càmera ubicada al sostre. Posteriorment, els vídeos van ser processats i analitzats amb el programa EthoVision XT 11.5 (Noldus Information Technology). Es va obtenir la distància total recorreguda



per cada ratolí durant 30 minuts i un patró representatiu del recorregut seguit. A més a més, digitalment també es va delimitar una zona central de la caixa (28 x 18,5 cm) per analitzar-ne el temps que l'animal hi romania i així estudiar conductes associades a l'estrès.

### **3.7 Test d'enterrament d'objectes**

El test d'enterrar objectes (*marble burying*) permet avaluar el comportament tipus compulsiu en ratolins alhora que la destresa en l'excavació (Deacon 2006; Angoa-Pérez et al. 2013) (Figura 15F). En aquest test es va fer servir un recinte (25 x 12 x 12 cm) amb uns 5 cm de serradures noves, dins del qual es van col·locar a la superfície 20 bales negres iguals en una disposició de quadrícula. Seguidament, es va introduir el ratolí d'estudi en el centre de la caixa amb llibertat de moviments durant 20 minuts. Passat aquest temps, es van comptabilitzar el nombre de bales enterrades parcialment o bé totalment en les serradures.

### **3.8 Conducta d'excavació**

Els ratolins presenten una predisposició a excavar quan són exposats a un ambient nou i aquesta activitat involucra la coordinació de moviments (Deacon 2006). Per a determinar la conducta d'excavació, el ratolí d'estudi es va ubicar en un recinte (25 x 12 x 12 cm) amb uns 5 cm de serradures noves durant 3 minuts. Durant aquest període es va comptabilitzar la latència a excavar per primera vegada, el nombre de vegades que començava l'acció d'excavar i el temps total excavació.

### **3.9 Test d'interacció social**

L'estudi de la interacció social es va dur a terme en una caixa de metacrilat transparent (60 x 40 x 25 cm) distribuïda en 3 compartiments comunicats per una sola entrada (*3-Chamber test*) (Figura 15G). En el centre de cada compartiment

lateral hi havia ubicat una gàbia cilíndrica amb reixes amb capacitat per introduir-hi un ratolí. El test va consistir en dues sessions consecutives de 10 minuts, una d'habitució i una de socialització. En la primera part, els dos cilindres amb reixes estaven buits i es va ubicar el ratolí d'estudi en el compartiment central durant 10 minuts. En la segona part, es va introduir un ratolí desconegut en un dels cilindres amb reixes i es va ubicar de nou el ratolí d'estudi en el centre durant 10 minuts més. El ratolí d'estudi en tot moment podia moure's lliurement pels 3 compartiments i interaccionar amb el ratolí desconegut a través de les reixes. El ratolí desconegut era un subjecte nou i diferent en cada sessió.

En el mateix moment del test, es va cronometrar el temps d'interacció entre el ratolí d'estudi i el ratolí desconegut, considerant interacció quan el nas del ratolí d'estudi explorava al desconegut. Altrament, es va comptabilitzar el temps d'exploració del cilindre buit per part del ratolí d'estudi. Es va calcular l'índex de discriminació social [(temps interacció animal desconegut – temps interacció gàbia buida)/ temps total interacció] pel qual valors >0,6 van determinar una preferència per la socialització.

### **3.10 Test d'exploració d'un objecte nou**

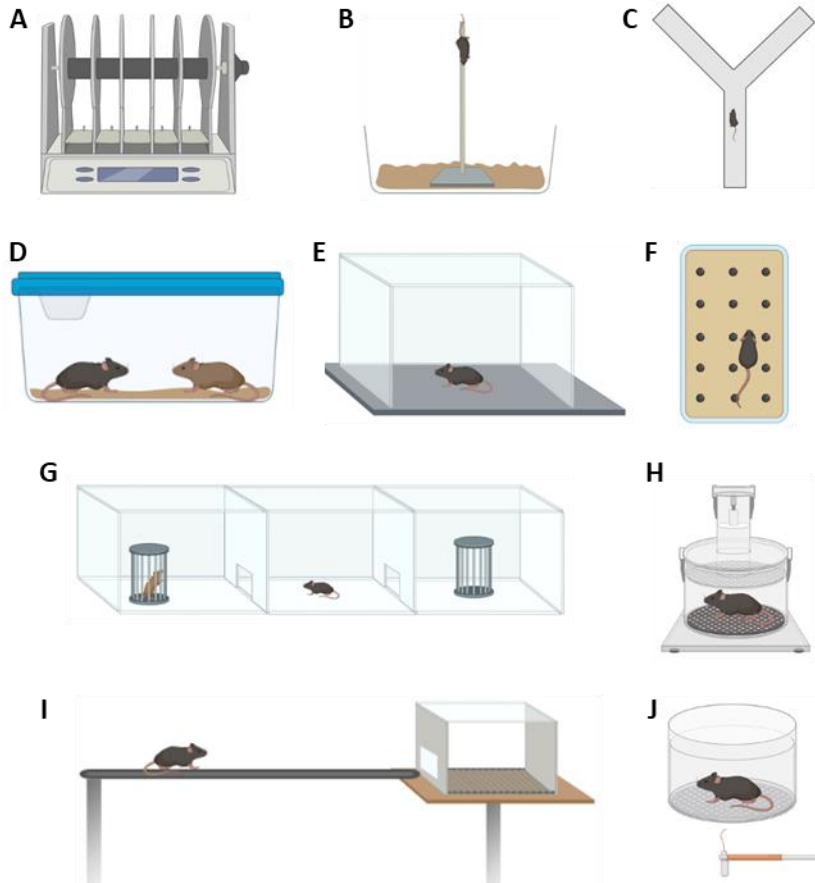
Per tal d'avaluar la capacitat exploratòria dels ratolins es va analitzar el temps d'interacció amb un objecte nou i inanimat. Per aquesta fi, es va habituar el ratolí en una caixa blanca de metacrilat (56 x 36,5 x 31 cm) sense cap objecte per un període de 10 minuts i posteriorment es va introduir un cargol metàl·lic en el centre de la caixa, tot deixant la lliure exploració del ratolí durant 10 minuts addicionals. Es van comptabilitzar el nombre de vegades que el ratolí explorava activament l'objecte i la seva duració.

### **3.11 Pletismografia de cos sencer**

La funció respiratòria va ser analitzada amb la tècnica de la pletismografia de cos sencer, per la qual el ratolí es col·loca en un cilindre hermètic on té llibertat de moviments (Prada-Dacasa et al. 2020; Lim et al. 2014) (Figura 15H). Es va utilitzar un pletismògraf per ratolins de cos sencer sense restriccions de moviment de 90 mm de diàmetre (EMMS, #PLY310). Cada animal va estar ubicat durant 1 hora en el pletismògraf. Per tal d'evitar artefactes deguts al moviment, els primers 45 minuts permetien l'habitució de l'animal a la cambra hermètica. Posteriorment, es van enregistrar els valors dels últims 15 minuts. Les dades van ser extretes i analitzades amb el programa eDacq Single Subject Version 1.9.0 (EMMS, #ESS101A). Els paràmetres respiratoris estudiats, aplicant la correcció pel pes corporal, van ser el volum corrent (volum d'aire inspirat i expirat en un cicle normal de respiració), la freqüència respiratòria i el volum per minut (multiplicació dels dos paràmetres anteriors).

### **3.12 Test del llistó horitzontal**

Per tal d'avaluar l'equilibri i la coordinació motora, els ratolins van ser col·locats sobre un llistó horitzontal (*balance beam*) d'1 m de longitud i 1 cm de diàmetre alçat 40 cm de la superfície (Figura 15I). Els ratolins van realitzar l'activitat dues vegades amb 5 minuts de descans. Per incentivar els ratolins a creuar el llistó, al final del recorregut es va col·locar una caixa amb una única entrada i així atraure'ls a mode de refugi. Els animals van ser habituats a l'activitat 2 dies abans del test. Es va comptabilitzar el temps total destinat a travessar el llistó i la distància recorreguda. Un temps màxim de 60 segons de recorregut va ser establert, així com si l'animal queia del llistó.



**Figura 15. Representació dels principals test de conducta realitzats. A)** Test giratori del *rotarod*. **B)** Test del llistó vertical. **C)** Test del laberint en “Y”. **D)** Test d’intrusió de ratolí desconegut. **E)** Test de camp obert. **F)** Test d’enterrament d’objectes. **G)** Test d’interacció social. **H)** Pletismografia de cos sencer. **I)** Test de llistó en horitzontal. **J)** Test de Von Frey. Les representacions no estan a escala.

### 3.13 Test de Von Frey

El test de Von Frey va ser utilitzat per estudiar la sensibilitat al dolor (nocicepció) dels ratolins per mitjà de l’aplicació d’un estímul mecànic extern amb un algesímetre electrònic (Bioseb) (Campana and Rimondini 2021) (Figura 15J). Els ratolins van ser individualitzats en una superfície de reixa envoltada per una caixa de metacrilat durant 15 minuts els 3 dies previs al test per la seva habituació. El dia del test, van

ser habituats durant 15 minuts abans de començar. Es va aplicar de manera gradual pressió en el centre de la planta d'una de les extremitats posteriors amb una agulla de 27G de diàmetre fins que el ratolí va retreure l'extremitat. Es van realitzar 6 sessions consecutives amb un interval de 5 minuts d'espera entre sessions i se'n va calcular la mitjana. El llindar mecànic s'expressa com la força que cal aplicar per tal que el ratolí retregui l'extremitat com a resposta a l'estímul.

#### **4. Estudi de la conducció nerviosa**

La conducció nerviosa va ser analitzada en col·laboració amb el Dr. Xavier Navarro de l'Institut de Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona. El dia del test els ratolins van ser anestesiats amb ketamina (100 mg/kg) i xilacina (10mg/kg) intraperitonealment durant 30 minuts. Per tal d'avaluar la conducció nerviosa motora, el nervi ciàtic va ser estimulat a través de la pell amb polsos únics de 0,05 ms de durada gràcies a dos elèctrodes ubicats en l'inici del nervi ciàtic i una de les extremitats. El potencial d'acció muscular compost (CMAP, ona M) i el reflex de l'ona H van ser registrats en els músculs interossis plantars (PL) i els músculs tibials anteriors (TA) amb elèctrodes de micro-agulles (Navarro and Udina 2009). Seguidament, amb l'objectiu d'analitzar la conducció nerviosa sensorial, els elèctrodes van ser ubicats en el quart dit d'una de les extremitats per tal d'enregistrar el potencial d'acció nerviós sensorial compost (SNAP) després d'estimular el nervi ciàtic tal com s'ha detallat anteriorment. Els potencials van ser amplificats i enregistrats per un oscil·loscopi digital (Tektronix #450S) amb els paràmetres adequats per tal de mesurar des de l'amplitud basal fins al màxim pic negatiu. Es va calcular l'amplitud màxima de les ones M i H, així com la relació H/M per avaluar la funció del reflex espinal.

Per tal d'analitzar les connexions motores centrals, els potencials motors evocats (MEP) van ser enregistrats en el múscul TA com a resposta a l'estimulació elèctrica transcranial del cervell amb polsos de 0,1 ms. Es va ubicar l'elèctrode positiu (càtode)

de manera subcutània en el crani en la zona del còrtex sensor-motor i l'elèctrode negatiu (ànode) en el nas del ratolí. Seguidament, es va mesurar la latència i l'amplitud de les ones màximes. Els diferents elèctrodes van ser ubicats sempre en les mateixes àrees gràcies a la utilització d'un microscopi. Durant els 30 minuts aproximadament de l'enregistrament, es va mantenir la temperatura corporal dels animals ( $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) mitjançant una manta elèctrica.

## 5. Histologia i immunofluorescència

Els ratolins van ser eutanasiats a diferents edats: 3, 6, 9 o 12 mesos. Tot seguit, se'ls va extreure el cervell i es va fixar en una solució de paraformaldehid al 4% (PFA, #1004965000, Merck Millipore) durant 24 hores a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriorment, es van mantenir durant 48 hores en una solució al 30% de sucrosa (#84097, Sigma Aldrich) en PBS 1x (#524650-1EA, Sigma Aldrich) a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalment, van ser congelats amb gel sec i seccionats coronalment a  $30\mu\text{m}$  amb el criòstat. Les diferents seccions es van conservar en solució anti-congelant, formada per un 40% d'etilenglicol (#102466, Sigma Aldrich), un 30% de glicerol (#G7757, Sigma Aldrich) i un 30% de tampó fosfat (0,1M,  $\text{pH}=7,2-7,4$ ) a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins a la seva utilització.

Per a l'assaig d'immunofluorescència, es van fer 3 rentats de 5 minuts en agitació a les mostres amb una solució de PBST (PBS 1x amb 0,2% de Tritó X-100, #648466, Sigma Aldrich). A continuació, la mostra es va bloquejar durant 1 hora en agitació lenta amb PBST amb 10% de NDS (*Normal Donkey Serum*, #JAC-017-000-121, Jackson Immuno Research). Seguidament, es va realitzar la incubació amb l'anticòs primari durant tota la nit en agitació suau a  $4^{\circ}\text{C}$ . L'anticòs primari va ser diluït segons la Taula 13 en PBST amb 1% de NDS. L'endemà, es van realitzar 3 rentats de 5 min en agitació amb PBST per tal de retirar l'anticòs primari no unit. Posteriorment, es va prosseguir amb la incubació de l'anticòs secundari durant 1 hora a temperatura ambient en agitació suau i protegit de la llum. L'anticòs secundari també es va preparar en PBST

## Material i mètodes

amb un 1% de NDS segons les dilucions indicades en la Taula 13. Per acabar, es van dur a terme 2 rentats de 5 min amb PBST i 1 amb PBS 1x.

Els talls van ser col·locats en portaobjectes amb medi de muntatge Fluoromount G amb DAPI (#17984-24, Electron Microscopy Sciences) i protegits amb un cobreobjectes. Passades 24 hores, van ser analitzats per microscòpia amb els equips d'epifluorescència Nikon Eclipse 90i, EVOS M5000 o microscopi confocal Olympus FV3000. Finalment, les imatges van ser processades amb el programa lliure ImageJ (versió 1.52p).

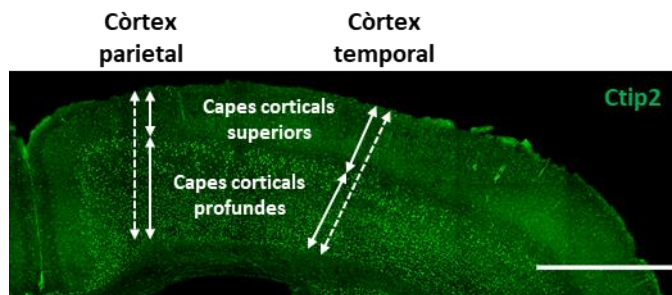
**Taula 13. Llistat d'anticossos primaris i secundaris utilitzats en immunofluorescència.**

<b>Anticòs primari</b>	<b>Dilució</b>	<b>Referència i casa comercial</b>
Anti-HA (SG77) ( <i>Rabbit</i> )	1:500	#71-5500 (Thermo Fisher Scientific)
Anti-GFAP ( <i>Chicken</i> )	1:1000	#ab4674 (Abcam)
Anti-IBA1 ( <i>Rabbit</i> )	1:1000	#019-19741 (Wako)
Anti-CTIP2 ( <i>Rat</i> )	1:100	#ab18465 (Abcam)
<b>Anticòs secundari</b>	<b>Dilució</b>	<b>Referència i casa comercial</b>
Goat Anti-Chicken IgY H&L (Alexa Fluor 488) preadsorbed	1:500	#ab150173 (Abcam)
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 conjugate	1:500	#A31572 (Invitrogen)
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 conjugate	1:500	#A21207 (Invitrogen)
Donkey anti-Rat IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1:100	#A21208 (Invitrogen)

## 6. Anàlisi de les capes corticals

El marcador cortical CTIP2 s'expressa en les capes profundes del còrtex, concretament en les capes 5 i 6 (Hevner 2007). Aquesta expressió diferencial de CTIP2 va permetre distingir les capes corticals superiors (capes 1-4) de les capes corticals profundes (capes 5 i 6) en les imatges d'immunofluorescència. Es va mesurar el gruix de les capes superiors i de les capes profundes corticals en dues

àrees: el còrtex parietal i el còrtex temporal mitjançant el programa ImageJ (Figura 16) en ratolins Cck:Ndufs4cKO i els respectius controls a 3, 6, 9 i 12 mesos d'edat. La mitjana del gruix de 3 talls consecutius (Bregma 0,74 mm fins -1.06 mm) dels dos hemisferis de 3-4 animals per condició va ser representada en els resultats. Paral·lelament, es va determinar el gruix total del còrtex com la suma de les capes superiors més les capes profundes, sense tenir en compte el cos callós. Aquests experiments es van dur a terme en el laboratori del Dr. Sergi Simó a la Universitat de Califòrnia, Davis, com a part de l'estada predoctoral de 3 mesos.



**Figura 16. Esquema de la mesura de les capes corticals.** Les àrees es defineixen segons l'absència de marcatge per Ctip2 en les capes superiors del còrtex (capes 1-4) i marcatge positiu en les capes profundes (capes 5 i 6) i es van determinar en dues àrees: còrtex parietal i còrtex temporal. El gruix total del còrtex va ser calculat com la suma de les capes superiors més les capes profundes (fletxa discontinua). Escala = 1000µm.

## 7. Anàlisi d'expressió gènica en una població neuronal específica

### 7.1 Obtenció de mostres cerebrals del còrtex parietal i còrtex temporal

Els ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO i els seus respectius controls (Cck:RiboTag:Ndufs4cCT) van ser sacrificats als 6 mesos d'edat i immediatament se'n va extreure el cervell, el qual es va col·locar de manera ventral en una matriu cerebral amb separacions d'1mm (#69022, Electron Microscopy Sciences) en gel. A continuació, es va fer una dissecció de 3 mm de gruix de la part central del cervell amb dues ganivetes ubicades en les posicions 5 i 8 de la matriu cerebral (Figura 17A). Seguidament, a partir d'aquest tall se'n van separar manualment les següents àrees: la part superior del còrtex es va disseccionar com a còrtex parietal i la resta del còrtex



## Material i mètodes

es va anomenar còrtex temporal (Figura 17B). Els teixits van ser congelats directament en nitrogen líquid i es van guardar a -80°C pel seu posterior anàlisi. Es va treballar amb 4 animals per cada grup.

### **7.2 Aïllament de ribosomes citosòlics específics de la població neuronal CCK (metodologia RiboTag)**

Les diferents mostres d'interès van ser homogeneïtzades individualment en 1 mL de tampó d'homogeneïtzació RiboTag (Taula 14), per tal d'obtenir una concentració final del 5% pes/volum. Es va utilitzar un homogeneïtzador de vidre tipus Dounce de 2mL (#D8938-1SET, Sigma Aldrich) per disgregar el teixit amb 40 passades mecàniques i consecutives amb una mà de morter fina (A) i 40 amb una mà de morter gruixuda (B). Aquest procés es va realitzar mantenint sempre les mostres en gel. A continuació, el llistat cel·lular es va centrifugar a 10.000g durant 10 minuts a 4°C i se'n va guardar el sobrenedant. Posteriorment, es van retirar 50 µL d'aquest sobrenedant (*Input*), on s'hi van afegir 300 µL de tampó RLT (#74004, Qiagen) amb un 10% de β-mercaptoetanol (#63689, Sigma Aldrich) per tal d'extreure l'RNA més endavant. La resta del sobrenedant es va incubar amb 4 µL de l'anticòs α-HA (#901514, BioLegend) en rotació suau durant 4 hores a 4°C. A continuació, es van afegir 200 µL de boles magnètiques *Pierce Protein A/G magnetic beads* (#88803, ThermoScientific) prèviament equilibrades en tampó d'homogeneïtzació RiboTag per completar la immunoprecipitació dels ribosomes marcats amb l'anticòs α-HA.

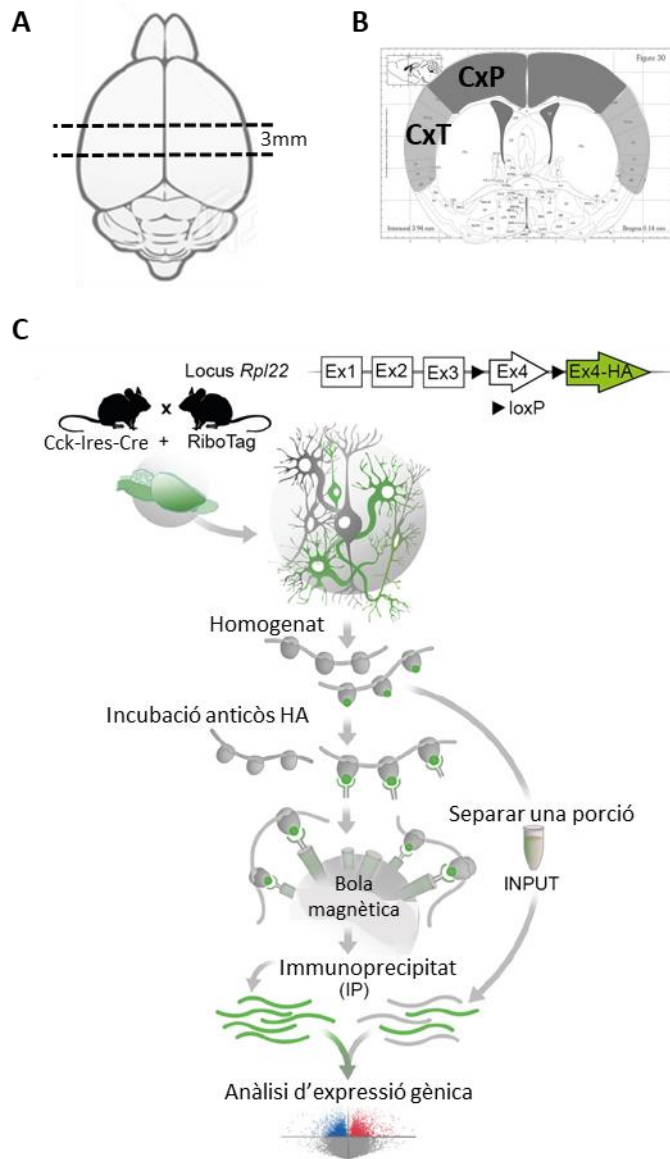
La captura dels immuno-complexes es va realitzar en agitació suau durant tota la nit a 4°C. L'endemà, amb l'ajuda d'un suport magnètic (#12320D, Thermo Fisher Scientific), es va retirar amb compte la fracció no conjugada o sobrenedant. A les boles magnètiques unides a la mostra d'interès se'ls van realitzar 3 rentats en agitació mitjana durant 10 minuts a 4°C amb 800 µL de tampó de rentat RiboTag (Taula 14). Una vegada finalitzat l'últim rentat, es van afegir 350 µL de tampó RLT amb 10% de β-mercaptoetanol. La mostra va ser barrejada enèrgicament amb

l'ajuda d'un vòrtex durant 30 segons. Finalment, es van separar les boles magnètiques de la mostra immunoprecipitada (IP) (Figura 17C). Les mostres *Input*, sobrenedant i IP obtingudes es van emmagatzemar a -80°C pel seu posterior anàlisi (Sanz et al. 2019).

**Taula 14. Reactius del tampó d'homogeneïtzació RiboTag per un volum final d'1 mL i tampó de rentat RiboTag per un volum final de 5 mL per l'extracció del traductoma citosòlic amb la tècnica del RiboTag.**

<b>Tampó d'homogeneïtzació RiboTag</b>	<b>Volum (µL)</b>	<b>Referència comercial</b>
H <sub>2</sub> O sense nucleases	723	#46-000-CM, Corning
Nonidet P40 Substitute 10% (4°C)	95,6	#11332473001, Sigma Aldrich
KCl 1M (4°C)	95,6	#P9541, Sigma Aldrich
Tris 1.5M, pH = 7,4 (4°C)	32	#648311, Merck Millipore
MgCl <sub>2</sub> 1M (4°C)	11,5	#63068, Sigma Aldrich
Cicloheximida 5mg/mL (-20°C)	20	#C7698, Sigma Aldrich
Inhibidors de proteases 100x (-20°C)	10	#P8340, Sigma Aldrich
Heparina 100mg/mL (4°C)	10	#H3393-100KU, Sigma Aldrich
RNasin Plus RNase Inhibitor (-20°C)	5	#N2615, Promega
dL-Dithiothreitol (DTT) 1M (-80°C)	1	#646563, Sigma Aldrich
<b>Tampó de rentat RiboTag</b>	<b>Volum (µL)</b>	<b>Referència comercial</b>
H <sub>2</sub> O sense nucleases	2.670	#46-000-CM, Corning
Nonidet P40 Substitute 10% (4°C)	500	#11332473001, Sigma Aldrich
KCl 1M (4°C)	1.500	#P9541, Sigma Aldrich
Tris 1.5M, pH = 7,4 (4°C)	167	#648311, Merck Millipore
MgCl <sub>2</sub> 1M (4°C)	60	#63068, Sigma Aldrich
Cicloheximida 5mg/mL (-20°C)	100	#C7698, Sigma Aldrich
dL-Dithiothreitol o DTT 1M (-80°C)	2,5	#646563, Sigma Aldrich

## Material i mètodes



**Figura 17. Descripció de la dissecció cortical i de l'estratègia RiboTag.** **A)** Visió dorsal de la ubicació de les ganivetes amb 3 mm de separació. **B)** Visió coronal de la dissecció manual del còrtex parietal (CxP) representat en gris fosc i el còrtex temporal (CxT) representat en gris clar. **C)** La immunoprecipitació amb anticossos  $\alpha$ -HA permet capturar específicament els ribosomes de les neurones CCK per aïllar-ne el mRNA (IP) i posteriorment comparar-lo amb l'expressió de tot el teixit (*Input*).

### 7.3 Extracció, quantificació i control de qualitat d'RNA

L'RNA va ser extret seguint el protocol descrit pel fabricant en *RNeasy Mini Kit* (#74104, Qiagen) basat en la precipitació de l'RNA en columnes de sílice. Prèviament a l'extracció de l'RNA, es van centrifugar les mostres a 3.000 g durant 3 minuts a temperatura ambient per tal d'eliminar qualsevol element no desitjat que pogués obturar la columna. A més a més, tal com s'indica en el protocol, totes les mostres van ser digerides amb DNasa I (2,7 U/ $\mu$ L) per eliminar les restes del DNA genòmic. Finalment, es van obtenir 30  $\mu$ L d'RNA en H<sub>2</sub>O lliure de nucleases a diferents concentracions.

La quantificació de l'RNA es va dur a terme espectrofotomètricament en un Nanodrop One (Thermo Scientific) amb 1  $\mu$ L de cada mostra. Aquelles mostres que van presentar una concentració d'RNA <30 ng/ $\mu$ L es va verificar la seva quantificació amb el protocol de *Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit* (#R11490, Invitrogen). Aquest assaig es basa en la interpolació en una corba lineal establerta utilitzant estàndards de baixa concentració amb un mínim de dos replicats per mostra. La identificació de les espècies del rRNA i la integritat de l'RNA obtingut es va determinar amb l'equip Bioanalyzer 2100 (Agilent) i els xips Agilent RNA 6000 Nano (#5067-1511, Agilent) per mostres de  $\geq$ 10 ng/ $\mu$ L. Totes les mostres van presentar un RIN (*RNA Integrity Number*) proper a 10, el qual és el màxim.

### 7.4 Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant qRT-PCR

La quantificació de l'expressió dels diferents transcrits (mRNA) es va dur a terme mitjançant PCR quantitativa amb transcripció inversa o retrotranscripció (qRT-PCR). Es van utilitzar els kits comercials *Power SYBR Green RNA-to-CT 1-Step Kit* (#4389986, Applied Biosystems) o *TaqMan RNA-to-Ct 1-Step Kit* (#4392938, Applied Biosystems), en funció de si es va utilitzar l'agent fluorescent intercalant SYBR Green o bé sondes específiques TaqMan. Els cicles d'amplificació, temps i temperatura emprades en cada reacció es van mantenir les recomanades per la casa comercial. Mitjançant el

## Material i mètodes

mètode de corba estàndard (Sanz et al. 2015), es va determinar la quantitat relativa de cada transcrit, que posteriorment, es va normalitzar per la quantitat relativa del gen de referència cortical *Hprt* (Ramhøj, Axelstad, and Svingen 2019). Per cada reacció, es va determinar l'eficiència d'amplificació amb el software *AriaMx Real-time PCR System* (Agilent), acceptant eficiències entre 80-120% i amb un coeficient de la corba estàndard  $R^2 \geq 0,9$ . En totes les reaccions es va incloure un control negatiu amb H<sub>2</sub>O en comptes de mostra (*non-template control*, NTC) i, tant les mostres estàndard, les experimentals, com les NTC, es van analitzar per duplicat. Per quantitats inferiors a 1 ng/ $\mu$ L d'RNA es va utilitzar H<sub>2</sub>O amb tRNA de llevat (10  $\mu$ g/mL, #AM7119, Invitrogen) com a diluent amb la finalitat de mantenir la quantitat desitjada d'RNA final en cada mostra. En la Taula 15 està detallada la composició de les reaccions de cada qRT-PCR així com el llistat d'assaigs d'expressió gènica TaqMan (inclouen *primers* i sondes, Thermo Fisher Scientific, Taula 16) i els *primers* (Taula 17) utilitzats per l'anàlisi de l'expressió gènica. Els *primers* van ser dissenyats a través de Primer Express (Thermo Fisher Scientific) o bé obtinguts de Primer Bank (Spandidos et al., 2010), amb excepció dels *primers* dirigits al gen *Slc17a6* (Padilla et al. 2016).

**Taula 15. Composició de les reaccions de qRT-PCR per TaqMan o SYBR Green (volum per mostra).**

Reacció TaqMan	Volum ( $\mu$ L)	Reacció SYBR Green	Volum ( $\mu$ L)
TaqMan RT Enzyme Mix (40x)	0,5	RT Enzyme Mix (125x)	0,16
TaqMan RT-PCR Mix (2x)	10	RT-PCR Mix (2x)	10
Sonda Taqman	1	Primer FOR/REV	0,4/0,4
H <sub>2</sub> O sense nucleases	7,5	H <sub>2</sub> O sense nucleases	8,04
RNA estàndard/experimental	1	RNA estàndard/experimental	1
Volum final	20	Volum final	20

**Taula 16. Llistat d'assaigs d'expressió gènica TaqMan utilitzades per analitzar l'expressió gènica mitjançant qRT-PCR.**

Assaig d'expressió gènica TaqMan	Referència
Cck	Mm00446170_m1
Gad1	Mm04207432_g1
Gad2	Mm00484623_m1

**Taula 17.** Llistat de *primers* per SYBR utilitzats per analitzar l'expressió gènica mitjançant qRT-PCR.

<i>Primers</i>	<i>Seqüència</i>
Ndufs4_FOR	5'-TCGCTGAGACAGGGCGATGTT-3'
Ndufs4_REV	5'-TGTGTGTCCCGAGTCTGGTT-3'
Slc17a7_REV	5'-CAAAAGTTCGCAACGATGATGG-3'
Slc17a7_FOR	5'-GAGCGCAAATACATTGAGGATGC-3'
Slc17a6_FOR	5'-AGAGAGCGCAAATCTGCTAGGT-3'
Slc17a6_REV	5'-GCGTAGACGGGCATGGAT-3'
Cnp_FOR	5'-ACGAGTGCAAGACGCTATTC-3'
Cnp_REV	5'-CCGCTCGTGGTGGTATC-3'
Pvalb_FOR	5'-ATCAAGAAGGCGATAGGAGCC-3'
Pvalb_REV	5'-GGCCAGAAGCGTCTTTGTT-3'
Hprt_FOR	5'-AGCGTTTCTGAGCCATTGCT-3'
Hprt_REV	5'-GCTACCGCTCCGAAAGC-3'

### 7.5 Seqüenciació massiva del transcriptoma (RNA-Seq) i anàlisi bioinformàtic

Les mostres d'RNA van ser seqüenciades en el Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG) de Barcelona. Es van preparar les llibreries a partir 300-500 ng de mostra utilitzant el kit comercial *KAPA Stranded mRNA-Seq* (#KR0960, KapaBiosystems) en un equip Illumina HiSeq4000 obtenint una cobertura mínima de  $30 \times 10^6$  lectures per mostra. Cada fragment es va seqüenciar bidireccionalment amb 2 x 51 pb. Els anàlisis bioinformàtics també van ser realitzats al CNAG mitjançant el paquet estadístic Limma per determinar l'expressió diferencial entre les mostres. Els transcrits diferencialment associats a ribosoma (DAR) en comparació al grup control de les mostres IP o bé diferencialment expressats (DE) en les mostres *Input* dels assaigs RiboTag es van identificar amb un canvi relatiu o *fold change* (FC) superior a 2 i amb una significació estadística ajustada menor a 0,05 (*padj*). Finalment, els anàlisis d'ontologia gènica (GO) per la integració de les dades amb rellevància biològica es va utilitzar l'eina *online* WebGestalt, analitzant els grups funcionals de "processos biològics".

## **8. Anàlisi estadístic**

Els resultats estan representats de manera individual amb la mitjana  $\pm$  error estàndard (SEM) o bé com la mitjana  $\pm$  error estàndard (SEM), sinó s'indica el contrari en la figura. Els anàlisis estadístics utilitzats en cada cas estan descrits en cada figura. En tots els anàlisis s'ha determinat un valor  $p < 0,05$  com a significació estadística i s'ha utilitzat el programa GraphPad Prism 8.0.

*Nota: Alguns dels esquemes i figures s'han obtingut i dissenyat en la pàgina web Biorender.*

# Resultats

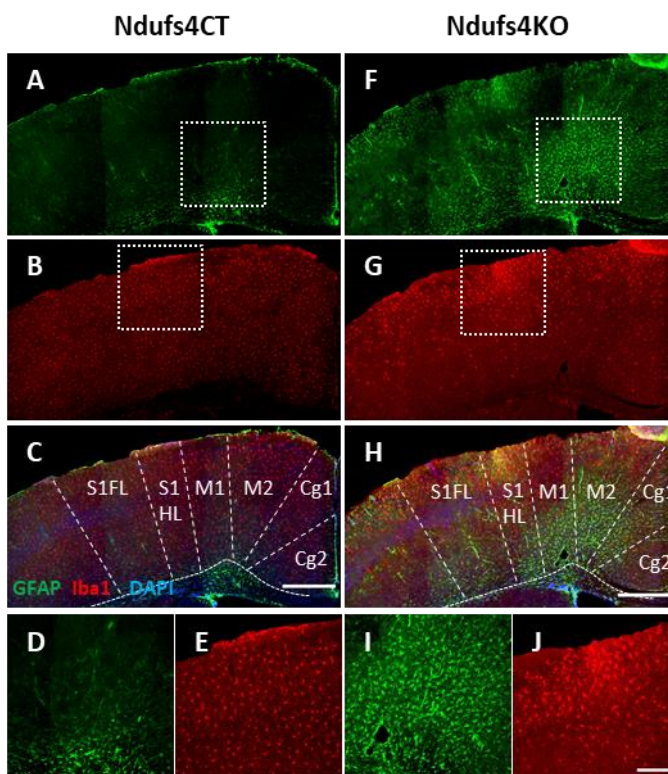
---





## **1. Anàlisi de la neuroinflamació cortical en ratolins amb deficiència constitutiva del gen *Ndufs4***

La deleció constitutiva de la subunitat NDUF54 del complex I mitocondrial en ratolins *Ndufs4*KO causa l'aparició de gliosis i deteriorament neuronal progressiu en àrees cerebrals definides, com són el BO, el cerebel, el nucli olivar inferior i el nucli vestibular (Quintana et al. 2010). Per tal d'avaluar la presència de neuroinflamació cortical en aquests ratolins, es va analitzar la reactivitat dels astròcits i la micròglia a través d'assajos d'immunofluorescència amb anticossos contra les proteïnes GFAP i Iba-1, respectivament, en estadis avançats de la malaltia. Aquest anàlisi va mostrar que els ratolins control presentaven micròglia no reactiva, ramificada i distribuïda de manera uniforme pel teixit així com absència d'astròcits reactius en el còrtex (Figura 18A-E). Pel contrari, en el còrtex dels ratolins *Ndufs4*KO es va detectar reactivitat astrocitària principalment en el còrtex motor (M1 i M2), juntament amb el còrtex somatosensorial (S1HL) (Figura 18F, I). Paral·lelament, es va posar de manifest la presència de zones amb una alta densitat de cèl·lules de la micròglia, les quals presentaven una morfologia hipertròfica consistent amb una micròglia reactiva (Figura 18G, J).



**Figura 18. Neuroinflamació cortical en ratolins *Ndufs4*KO.** A-J) Immunofluorescència pel marcador astrocítari GFAP (A, D, F, I), marcador microglial Iba1 (B, E, G, J) i la seva superposició amb la tinció nuclear DAPI (C, H) a P51. Els talls corresponents a ratolins *Ndufs4*KO presenten astrogliosis (F, I) i reactivitat glial (G, J) principalment en les àrees del còrtex motor primari (M1) i secundari (M2) i còrtex somatosensorial primari (S1HL). D, E, I, J) Magnificacions dels requadres puntejats indicats en A (D), B (E), F (I) i G (J). Imatges corresponents a la coordenada Bregma 0,14 mm (Cg1: còrtex cingulat àrea 1; Cg2: còrtex cingulat àrea 2; S1FL: còrtex somatosensorial primari, extremitats anteriors; S1HL: còrtex somatosensorial primari, extremitats posteriors) Escala (A-C, F-H) = 500µm; escala (D, E, I, J) = 200µm.

## 2. Dissecció de les poblacions neuronals corticals implicades en la neuroinflamació causada per deficiència del gen *Ndufs4*

Donada la severitat del fenotip dels animals *Ndufs4*KO, i per tal de determinar l'efecte de la deficiència del gen *Ndufs4* a nivell cortical, es van generar dues línies de ratolins amb pèrdua d'aquest gen de manera específica en dues de les poblacions neuronals més abundants a nivell cortical. Per una banda, es va deletar *Ndufs4* de neurones que expressen colecistocinina (CCK) (ratolí *Cck:Ndufs4*cKO), la qual

s'expressa tant en interneurons inhibitoris GABAèrgics com en neurones excitatòries glutamatèrgiques en el còrtex (Gallopín et al. 2006; Taniguchi et al. 2011; Calvigioni et al. 2017; Fuzik et al. 2016). Altrament, es va generar un ratolí amb deleció condicional del gen *Ndufs4* en neurones que expressen la proteïna d'unió al calci parvalbúmina (PVALB) (ratolí Pvalb:Ndufs4cKO). Les neurones PVALB positives són una de les poblacions d'interneurones GABAèrgics més abundants en el còrtex i l'hipocamp, presentant un patró d'activitat neuronal ràpid (Hu, Gan, and Jonas 2014; Whissell et al. 2015).

### **3. Alteracions estructurals del còrtex en ratolins amb deficiència del gen *Ndufs4* en neurones que expressen *Cck***

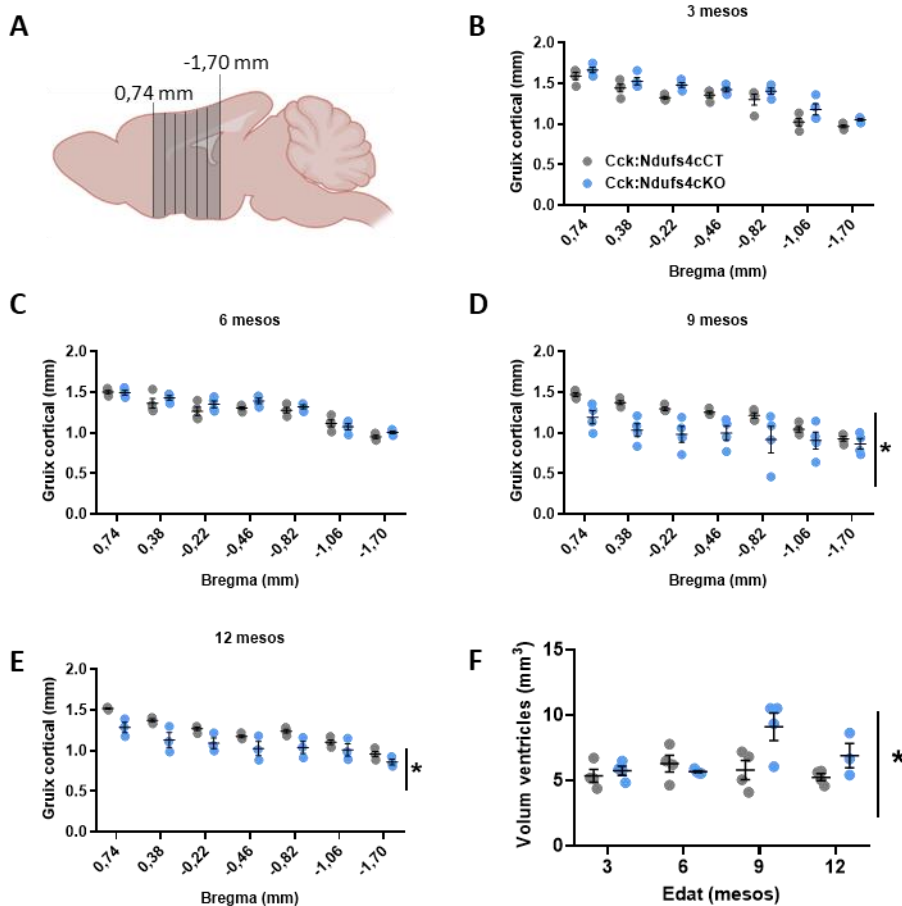
La RM és una tècnica no invasiva que permet obtenir informació *in vivo* sobre la composició i l'estructura d'òrgans interns mitjançant l'aplicació de diferents patrons d'excitació i captació de senyals. Així, per obtenir informació sobre l'estat i la microestructura del còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO, es varen analitzar imatges de contrast o relaxometria - ponderada en T2 (T2w), mapes de T2 i ponderada en T2\* (T2\*w) - per tal d'aconseguir informació sobre possibles alteracions estructurals, la seva quantificació i la presència d'hemorràgies, respectivament; imatges de tensor de difusió (mapes d'ADC) amb l'objectiu de quantificar la difusió de l'aigua i en darrer lloc anàlisi de la perfusió (rCBF) per tal d'examinar el flux sanguini.

El plantejament inicial cercava identificar la progressió de les alteracions corticals mitjançant un estudi longitudinal del cervell dels animals Cck:Ndufs4cKO als 3, 6, 9 i 12 mesos d'edat. No obstant això, després de la sessió dels 6 mesos d'edat, el 75% dels animals Cck:Ndufs4cKO no es van recuperar de l'anestèsia, tal i com es descriurà en més detall posteriorment (apartat 4.7), i van haver de ser sacrificats. Per aquest motiu, es van emprar ratolins diferents pels anàlisis a 9 i 12 mesos d'edat.

### **3.1 Reducció del gruix cortical i engrandiment dels ventricles en ratolins Cck:Ndufs4cKO d'edat avançada**

Durant l'adquisició de les imatges de RM es va posar de manifest una possible alteració anatòmica del cervell dels ratolins Cck:Ndufs4cKO que no presentaven els ratolins control. Concretament, en el gruix del còrtex i en la mida dels ventricles. Per aquest motiu, es va mesurar la distància entre el límit dorsal del còrtex i l'inici del ventricle i alhora es va quantificar el volum dels ventricles laterals i tercer ventricle en les seccions centrals del cervell (Bregma 0,74 mm fins a -1,70 mm) (Figura 19A).

Els nostres resultats mostren que el gruix cortical es va mantenir similar entre ratolins Cck:Ndufs4cKO i Cck:Ndufs4cCT fins als 6 mesos d'edat (Figura 19B, C). Posteriorment, a 9 i 12 mesos, els animals Cck:Ndufs4cKO presentaven una reducció significativa del gruix cortical en comparació amb els controls (Figura 19D, E). En paral·lel, a partir dels 9 mesos d'edat, els animals Cck:Ndufs4cKO exhibien un engrandiment dels ventricles laterals i del tercer ventricle en comparació als animals control (Figura 19F).



**Figura 19. Reducció del gruix cortical i engrandiment dels ventricles en ratolins Cck:Ndufs4cKO d'edat avançada.** **A)** Esquema de la distribució de les coordenades analitzades des de Bregma 0,74 mm fins -1,70 mm (Franklin & Paxinos, 2007). **B-E)** Gruiix del còrtex motor en animals Cck:Ndufs4cKO i controls a 3 (B), 6 (C), 9 (D) i 12 (E) mesos d'edat. Dades distribuïdes en seccions rostro-caudals (Bregma 0,74 mm fins -1,70 mm). **F)** Volum dels ventricles laterals i tercer ventricle de totes les seccions agrupades en les diferents edats en animals Cck:Ndufs4cKO i control. Dades analitzades amb ANOVA 2 factors (\* $p < 0,05$ ). Els resultats es representen de manera individual amb la mitjana  $\pm$  SEM ( $n=3-4$  per cada grup/temps).

### 3.2 Hiperintensitat cortical detectada per mapes de T2 en ratolins Cck:Ndufs4cKO

La relaxometria T2 permet analitzar, mitjançant el temps de relaxació de l'aigua, la restricció de moviment de les molècules d'aigua. Per aquest motiu, la presència de fluids, com el líquid cefalorraquidi o la sang, amb poca restricció de moviment, presenten temps alts de relaxació, observant-se una senyal brillant (hiperintensa) en

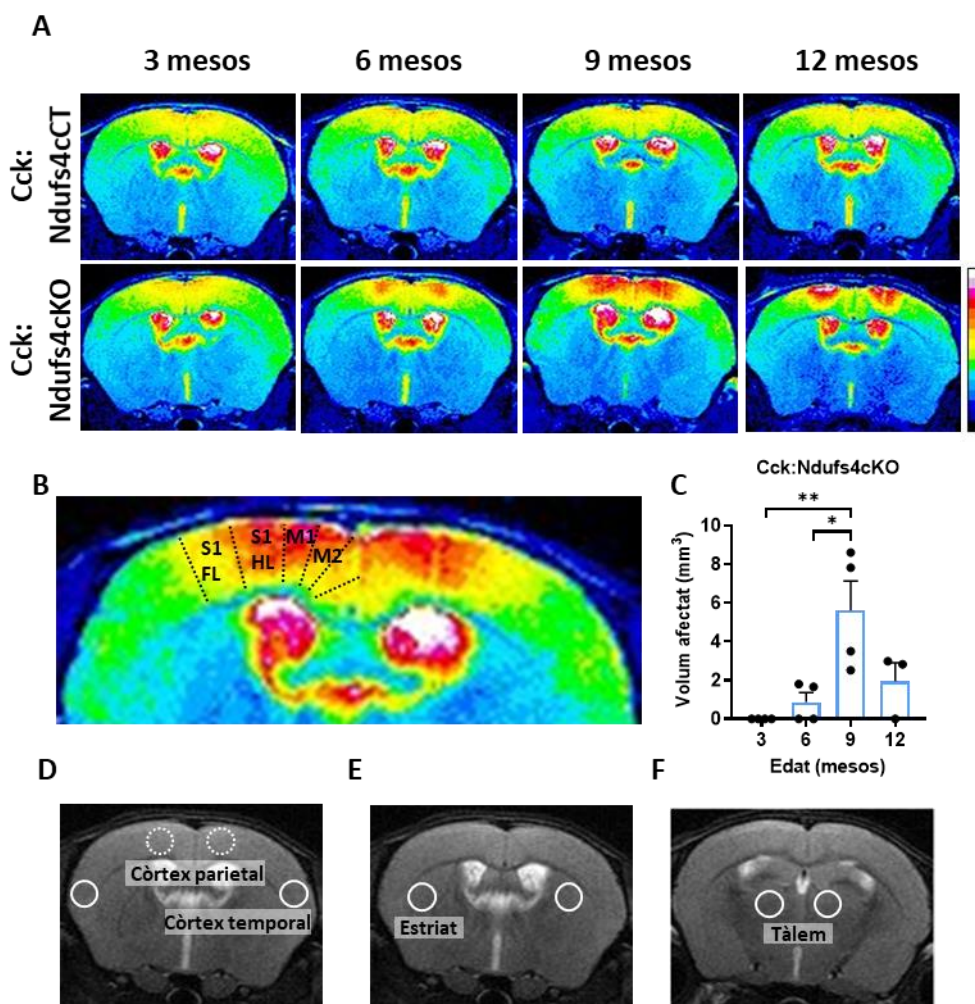
## Resultats

les imatges de T2w. Per altra banda, tant la substància blanca com la gris presenten valors més lents en el temps de relaxació T2 ja que les molècules d'aigua tendeixen a interaccionar amb macromolècules, detectant-se amb una senyal hipointensa, més fosca (Yousaf, Dervenoulas, and Politis 2018).

En les imatges de T2w es va apreciar un augment en la intensitat de la senyal en les àrees cerebrals del còrtex motor primari, secundari i somatosensorial primari a mesura que els animals *Cck:Ndufs4cKO* envellien (Figura 20A, B), observant-se els canvis més notables en la coordenada 0,46 mm posterior a Bregma. Qualitativament, l'augment en la senyal estava restringit al còrtex parietal i no s'estenia cap al còrtex temporal. Pel contrari, els animals *Cck:Ndufs4cCT* no presentaven canvis qualitius en les imatges de T2w en cap dels temps analitzats (Figura 20A). Les imatges de T2w també van permetre quantificar l'evolució del volum d'àrea afectada al llarg del temps. Es va detectar un augment significatiu en el volum amb senyal hiperintensa als 9 mesos en comparació als 3 i 6 mesos en els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* (Figura 20C), mentre que als 12 mesos no es registraven canvis en el volum lesionat respecte 3 i 6 mesos.

A partir d'aquestes mateixes imatges se'n deriven els mapes de T2, els quals es van quantificar delimitant quatre ROI de manera bilateral en cada secció seguint criteris d'abundància d'expressió de *Cck* i de presència o absència d'alteracions en les imatges de T2w. D'aquesta manera, es va seleccionar el còrtex parietal com a àrea que presentava una senyal hiperintensa en les imatges de T2w (Figura 20D). Seguidament, es va seleccionar el còrtex temporal com a àrea amb gran expressió de *Cck* però amb absència de canvis aparents en les imatges de T2w (Figura 20D). Per últim, es van ubicar dos ROI més en dues zones sense alteracions aparents en les imatges de T2w, un en una zona sense expressió de *Cck*, corresponent a l'estriat (Figura 20E), i un altre en una zona amb expressió de *Cck*, el tàlem (Figura 20F) (Lein et al. 2007). La quantificació es va realitzar en 8 seccions cerebrals consecutives per

tal d'estudiar l'abast de les possibles zones afectades (Bregma 0,74 mm fins a -2,30 mm).



**Figura 20. Progressió de la lesió cortical en seccions coronals representatives de T2w i volum de l'àrea afectada en ratolins Cck:Ndufs4cKO a diferents edats. A)** Imatges de T2w representatives, corresponents a la coordenada Bregma -0,46 mm de ratolins Cck:Ndufs4cKO i controls. **B)** Imatge augmentada del cervell de ratolí Cck:Ndufs4cKO als 9 mesos d'edat indicant zones corticals amb senyals T2w hiperintenses: còrtex motor secundari (M2); còrtex motor primari (M1); còrtex somatosensorial primari, extremitats posteriors (S1HL) i còrtex somatosensorial primari, extremitats anteriors (S1FL). **C)** Quantificació del volum cortical amb senyal hiperintensa realitzada en imatges de T2w en animals Cck:Ndufs4cKO. Es va determinar la presència d'hiperintensitat quan la senyal a còrtex era la mateixa que la dels ventricles. Dades analitzades amb ANOVA 1 factor (\*p<0,05; \*\*p<0,01). **D-F)** Ubicació dels ROI en 4 zones d'estudi: còrtex parietal (D), còrtex temporal (D), estriat (E) i tàlem (F) utilitzats per quantificar mapes de T2, mapes d'ADC i perfusió.



## Resultats

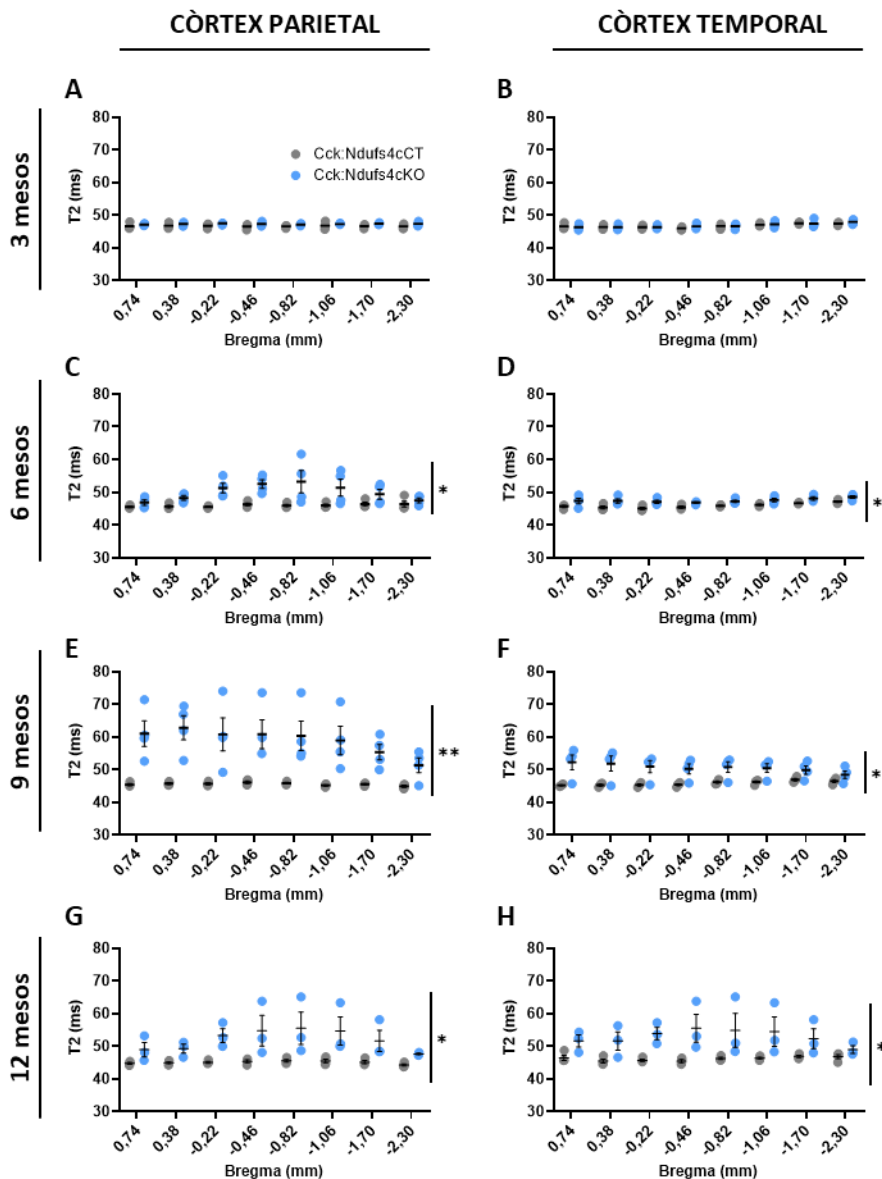
Els ratolins Cck:Ndufs4cKO de 3 mesos d'edat presentaven el mateix temps de relaxació T2 en comparació als controls al llarg de totes les seccions cerebrals analitzades, tant en el còrtex parietal com en el còrtex temporal (Figura 21A, B). Per tant, als 3 mesos d'edat no es detectava cap tipus d'anomalia cerebral mitjançant imatges de contrast en les àrees cerebrals seleccionades. Pel contrari, a partir dels 6 mesos d'edat els animals Cck:Ndufs4cKO manifestaven un temps de relaxació T2 significativament augmentat respecte als controls, tant en el còrtex parietal com en el còrtex temporal (Figura 21C-H). Cal destacar un augment en la dispersió dels valors quantificats als 9 i 12 mesos, relacionat amb la variabilitat individual de cada animal analitzat. Els canvis visuals més evidents en les imatges de T2w corresponien a la coordenada -0,46 mm segons Bregma, on es va fer evident l'augment del temps de relaxació T2 amb l'edat dels ratolins Cck:Ndufs4cKO (Taula 18).

**Taula 18. Temps de relaxació T2 del còrtex parietal en la coordenada -0,46 mm segons Bregma a diferents edats dels ratolins Cck:Ndufs4cKO i els seus respectius controls.** Dades indicades com la mitjana del temps de relaxació T2  $\pm$  SEM (ms).

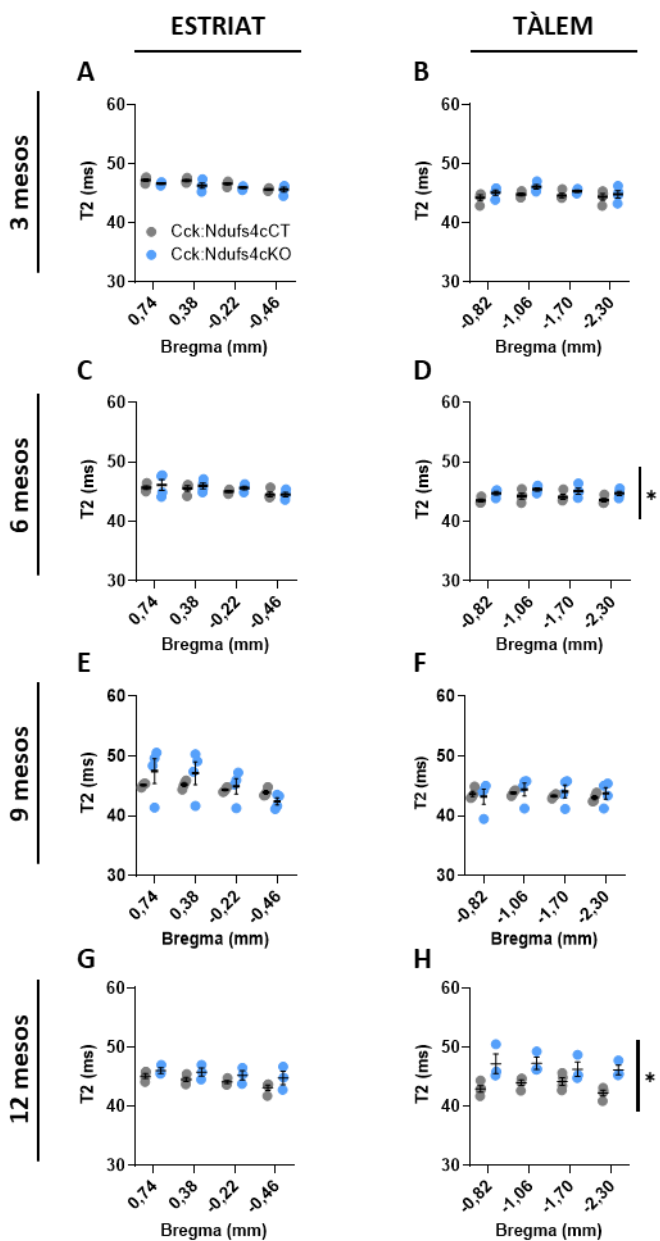
	3 mesos	6 mesos	9 mesos	12 mesos
Cck:Ndufs4cCT	46,5 $\pm$ 0,3	46,3 $\pm$ 0,4	46,1 $\pm$ 0,4	45,4 $\pm$ 0,4
Cck:Ndufs4cKO	47,3 $\pm$ 0,3	52,5 $\pm$ 1,3	60,8 $\pm$ 4,4	54,7 $\pm$ 4,6

Paral·lelament, l'anàlisi del temps de relaxació T2 a l'estriat no va mostrar alteracions en cap de les edats analitzades en els ratolins Cck:Ndufs4cKO (Figura 22A, C, E, G). No obstant, als 6 i 12 mesos d'edat l'àrea cerebral del tàlem presentava canvis en T2 en aquests ratolins (Figura 22B, D, F, H).

Senyals hiperintenses en imatges de T2w indiquen una alteració estructural del cervell, la qual pot estar causada per múltiples factors, tals com edema, infecció, isquèmia, inflamació, hemorràgies o tumors (Guzmán-De-Villoria, Fernández-García, and Ferreiro-Argüelles 2010; Yousaf, Dervenoulas, and Politis 2018). En funció del patró de les lesions detectades per T2w juntament amb d'altres tècniques de ressonància magnètica, els símptomes presentats pel pacient i l'historial clínic permeten determinar-ne el diagnòstic concret.



**Figura 21. Augment en el temps de relaxació T2 en el còrtex parietal i temporal de ratolins Cck:Ndufs4cKO a partir dels 6 mesos d'edat. A-H) Quantificació dels mapes T2 en les àrees cerebrals del còrtex parietal (A,C,E,G) i còrtex temporal (B,D,F,H) en animals Cck:Ndufs4cKO i controls a diferents edats: 3 mesos (A,B); 6 mesos (C,D); 9 mesos (E,F) i 12 mesos (G,H). Els resultats es representen de manera individual amb la mitjana  $\pm$  SEM. Dades analitzades estadísticament amb un test ANOVA de 2 factors (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) ( $n = 3-4$  per cada grup/temps). Dades distribuïdes en seccions rostro-caudals (Bregma 0,74 mm fins -2,30 mm).**



**Figura 22. Augment en el temps de relaxació T2 en el tàlem de ratolins Cck:Ndufs4cKO als 6 i 12 mesos d'edat. A-H)** Quantificació dels mapes T2 en l'estriat (A,C,E,G) i tàlem (B,D,F,H) d'animals Cck:Ndufs4cKO i controls amb 3 mesos (A,B), 6 mesos (C,D), 9 mesos (E,F) i 12 mesos (G,H) d'edat. Els resultats es representen de manera individual amb la mitjana  $\pm$  SEM. Dades analitzades amb ANOVA 2 factors (\* $p < 0,05$ ) ( $n = 3-4$  per cada grup/temps). Dades distribuïdes en seccions rostro-caudals [Bregma 0,74 mm fins -0,46 mm (estriat) i Bregma -0,82 mm fins -2,30 mm (tàlem)].

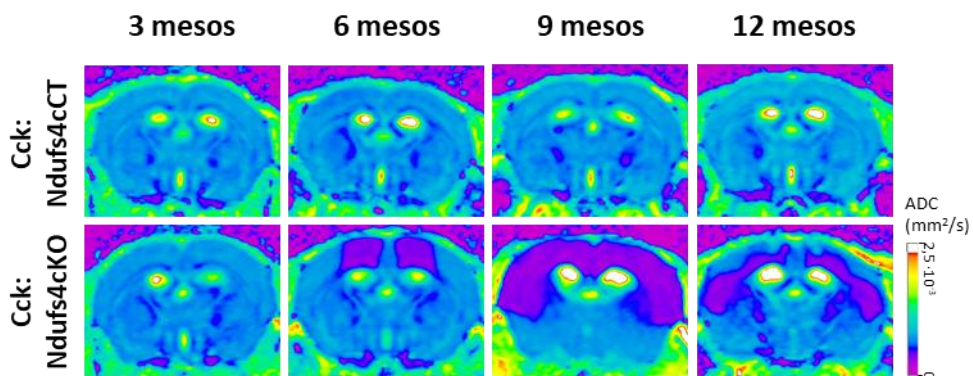
### 3.3 Els ratolins Cck:Ndufs4cKO mostren una disminució de la difusió en còrtex, estriat i tàlem

El coeficient aparent de difusió o ADC (*apparent diffusion coeficient*) és l'índex utilitzat per quantificar la difusió en les imatges de DTI. El coeficient d'ADC quantifica per tant, la mobilitat de les molècules d'aigua en un teixit biològic i es representa en els mapes d'ADC. Un augment en els valors d'ADC implica més llibertat de moviment en l'aigua, generalment causat per la pèrdua de la integritat en la barrera hematoencefàlica provocant una acumulació de fluids extracel·lularment, conegut com a edema vasogènic. Contràriament, la reducció en els valors d'ADC s'associa a un augment en la restricció de l'aigua, la qual s'acumula en l'espai intracel·lular ocasionant un edema citotòxic (Loubinoux et al. 1997; Michinaga and Koyama 2015).

En línia amb els resultats dels mapes de T2, es va observar una major alteració dels mapes d'ADC al voltant de la coordenada 0,58 mm posterior a Bregma, on s'identificava una disminució notable de la difusió en el còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO a partir dels 6 mesos d'edat (Figura 23). A aquesta edat la reducció en la difusió estava localitzada en M1 i M2 del còrtex parietal, mentre que a partir dels 9 mesos, s'advertí un increment significatiu de l'àrea afectada, abastant pràcticament tot el còrtex. La quantificació dels valors d'ADC en la coordenada -0,58 mm segons Bregma en el còrtex parietal va fer evident la disminució de la difusió en els animals Cck:Ndufs4cKO amb l'edat (Taula 19).

**Taula 19. Coeficient aparent de difusió del còrtex parietal en la coordenada -0,58 mm a diferents edats dels ratolins Cck:Ndufs4cKO i els respectius controls.** Dades indicades com la mitjana d'ADC  $\pm$  SEM ( $\text{mm}^2/\text{s}$ ).

	3 mesos	6 mesos	9 mesos	12 mesos
<b>Cck:Ndufs4cCT</b>	$0,75 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,017$	$0,78 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,012$	$0,75 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,02$	$0,78 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,02$
<b>Cck:Ndufs4cKO</b>	$0,75 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,013$	$0,35 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,07$	$0,46 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,1$	$0,52 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,08$

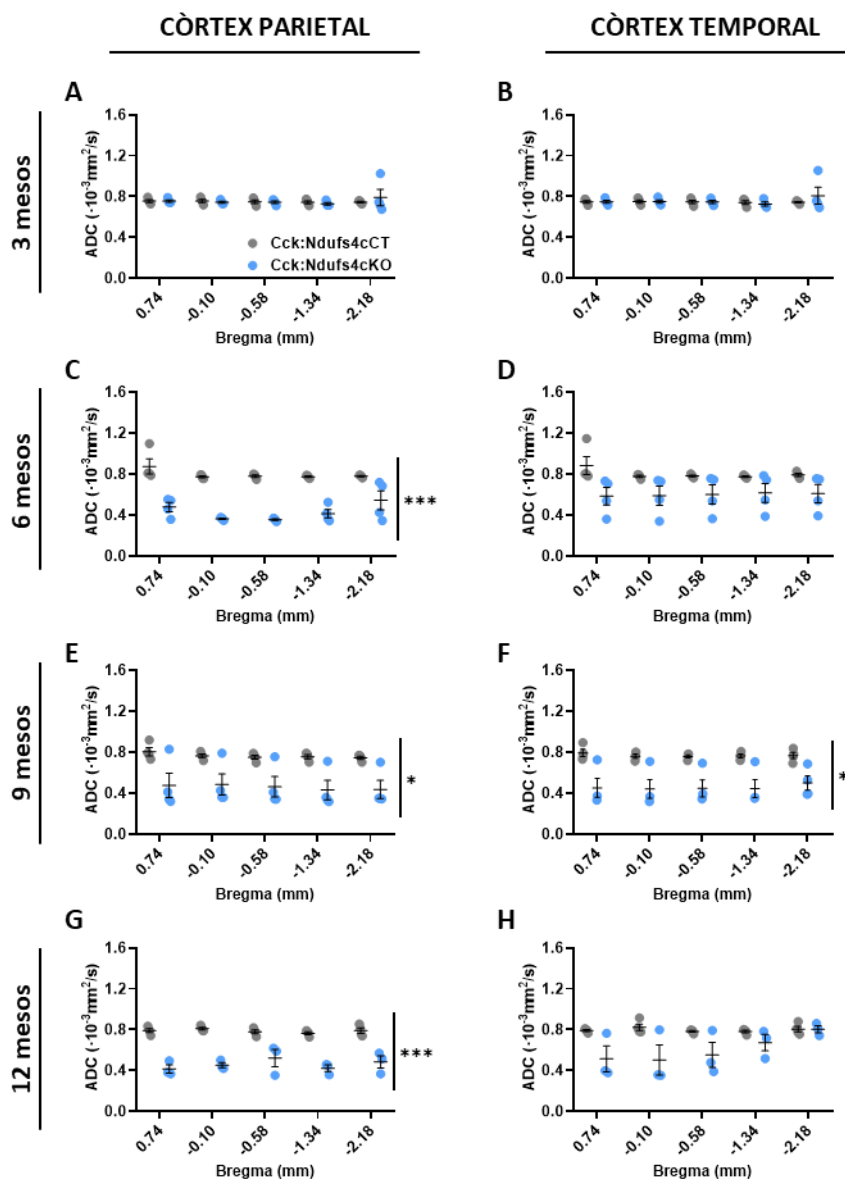


**Figura 23. Disminució progressiva de la difusió en seccions coronals representatives de mapes d'ADC en ratolins Cck:Ndufs4cKO a diferents edats. Imatges corresponents a la coordenada Bregma -0,58 mm i utilitzades posteriorment en la quantificació de la difusió en les Figures 24 i 25.**

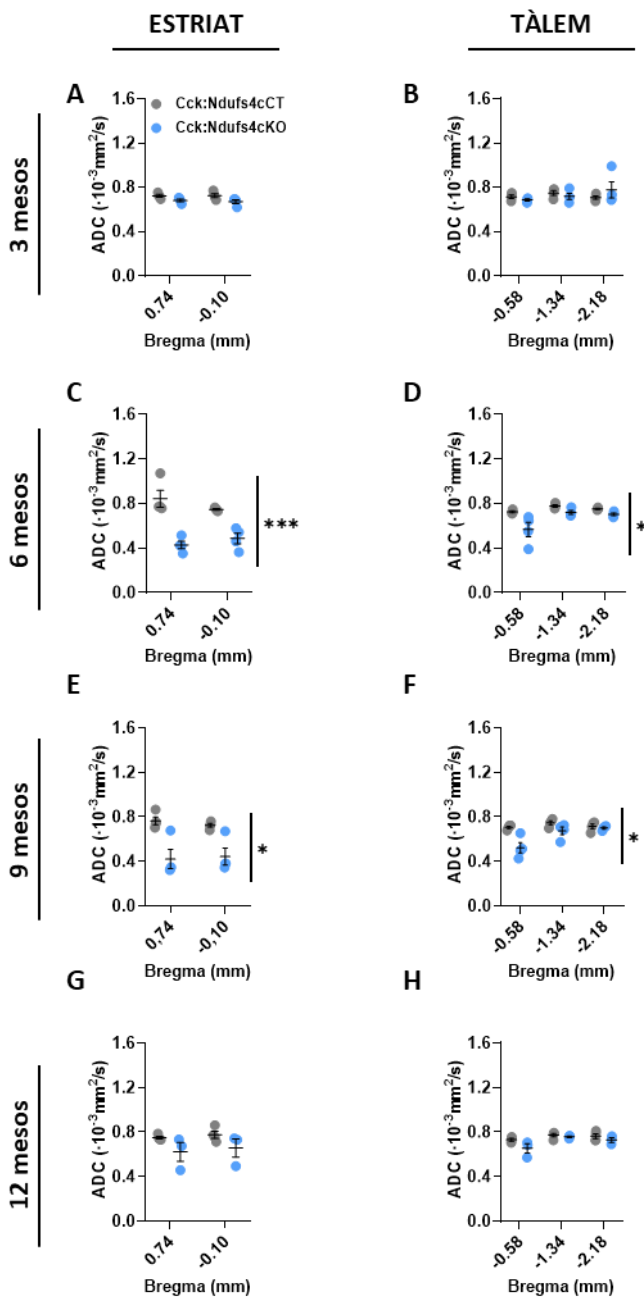
Per tal de determinar l'extensió de la lesió es van quantificar 5 seccions cerebrals consecutives (Bregma 0,74 mm fins a -2,18 mm) ubicant 4 ROIs localitzats en les àrees descrites prèviament en la quantificació dels mapes de T2 (apartat 3.2, Figura20D-F).

L'anàlisi quantitatiu de les diferents seccions va mostrar que els ratolins Cck:Ndufs4cKO als 3 mesos d'edat presentaven el mateix coeficient de difusió ADC tant en el còrtex parietal (Figura 24A) com en el temporal (Figura 24B) en comparació als controls. Pel contrari, als 6 mesos d'edat, els animals Cck:Ndufs4cKO van mostrar una reducció estadísticament significativa en la difusió en comparació als respectius controls en el còrtex parietal (Figura 24C). Tanmateix, els valors de difusió observats en el còrtex temporal eren iguals entre els dos grups d'estudi (Figura 24D). Possiblement, degut a diferències interindividuales en l'evolució de la lesió. A partir dels 9 mesos d'edat, les alteracions en el coeficient de difusió en els animals Cck:Ndufs4cKO en comparació als controls es van fer més evidents, sent aquests valors significativament inferiors en el còrtex parietal (Figura 24E) i temporal (Figura 24F) als 9 mesos i només en el còrtex parietal als 12 mesos d'edat (Figura 24G, H).

En quant a àrees no afectades aparentment en els mapes d'ADC, es va detectar una disminució significativa del coeficient de difusió als 6 i 9 mesos d'edat tant en l'estriat com en el tàlem d'animals Cck:Ndufs4cKO (Figura 25).



**Figura 24. Disminució en la difusió del còrtex parietal de ratolins Cck:Ndufs4cKO a partir dels 6 mesos d'edat. A-H)** Quantificació dels mapes d'ADC en les àrees cerebrals del còrtex parietal (A,C,E,G) i còrtex temporal (B,D,F,H) en animals Cck:Ndufs4cKO i controls a diferents edats: 3 mesos (A,B); 6 mesos (C,D); 9 mesos (E,F) i 12 mesos (G,H). Els resultats es representen de manera individual amb la mitjana ± SEM. Dades analitzades amb ANOVA 2 factors (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001) (n=3-4 per cada grup/temps) i distribuïdes en seccions rosto-caudals (Bregma 0,74 mm fins -2,18 mm).



**Figura 25. Disminució en la difusió en l'estriat i el tàlem en ratolins Cck:Ndufs4cKO de 6 i 9 mesos d'edat. A-H) Quantificació dels mapes d'ADC en les àrees cerebrals de l'estriat (A,C,E,G) i el tàlem (B,D,F,H) en animals Cck:Ndufs4cKO i controls a diferents edats: 3 mesos (A,B); 6 mesos (C,D); 9 mesos (E,F) i 12 mesos (G,H). Els resultats es representen de manera individual amb la mitjana  $\pm$  SEM. Dades analitzades amb ANOVA 2 factors (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) ( $n = 3-4$  per cada grup/temps) i distribuïdes en seccions rosto-caudals (Bregma 0,74 mm fins -2,18 mm).**

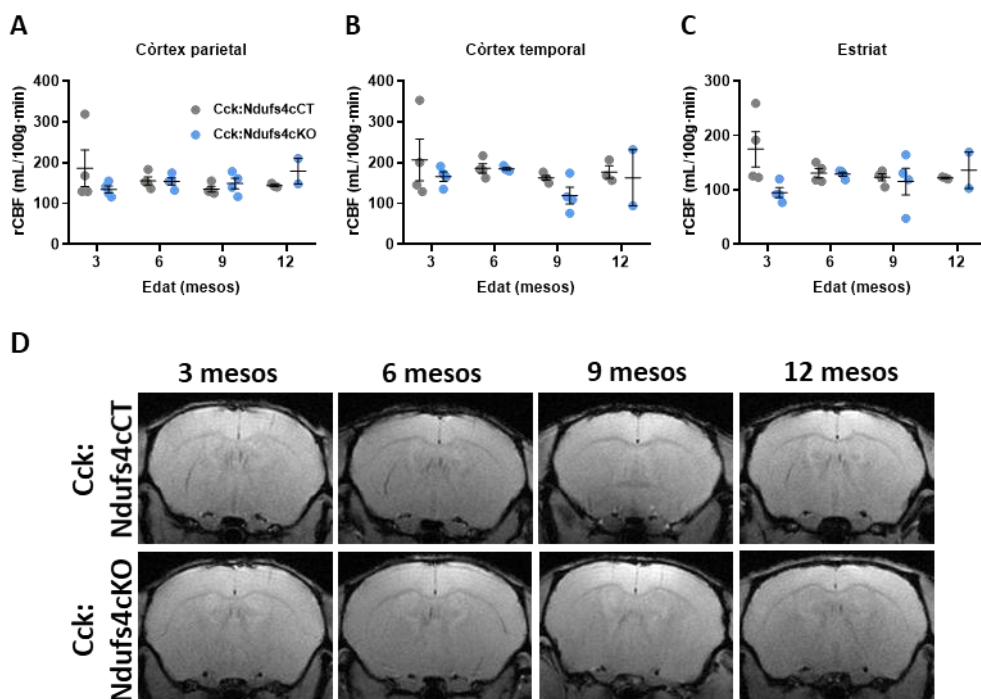
### **3.4 Absència d'alteracions en el flux sanguini i d'hemorràgies en el cervell dels ratolins Cck:Ndufs4cKO**

La perfusió és un altre paràmetre obtingut en l'anàlisi per RM que determina quantitativament el flux sanguini en un teixit. En aquest cas, es va aplicar la tècnica de marcatge de l'spin arterial (ASL) o flux sanguini cerebral relatiu (rCBF) pel qual s'aprofita el marcatge magnètic de la sang entrant i s'utilitza com a traçador endogen del flux sanguini (Jahng et al. 2014).

El rCBF va ser analitzat en un sol tall cerebral d'1mm de gruix (Bregma -0,10 mm fins -0,46 mm), agafant com a guia la secció amb més alteracions detectades en els mapes de T2 i ADC. Els ratolins Cck:Ndufs4cKO no presentaven alteracions en el flux sanguini del còrtex parietal, còrtex temporal ni l'estriat en els diferents temps analitzats en comparació als valors mostrats pels animals control (Figura 26A-C), la qual cosa descarta una implicació vascular en les anomalies corticals descrites anteriorment. Així mateix, la manca d'afectacions en el flux sanguini detectada entre els dos grups de ratolins, va ser addicionalment corroborada per l'absència d'hemorràgies aparents en les imatges de T2\*w (Figura 26D).



## Resultats



**Figura 26. Absència d'alteracions en el flux sanguini i d'hemorràgies en animals Cck:Ndufs4cKO.**

**A-C)** Quantificació del flux sanguini analitzat per perfusió (rCBF) entre les coordenades -0,10 mm i -0,46 mm segons Bregma en el còrtex parietal (A), còrtex temporal (B) i estriat (C) a diferents edats en animals Cck:Ndufs4cKO i els respectius controls. Els resultats es representen de manera individual amb la mitjana  $\pm$  SEM. Dades analitzades amb un test ANOVA de 2 factors ( $n=2-4$  per cada grup/temps). **D)** Imatges representatives de seccions coronals de T2\*w en ratolins Cck:Ndufs4cKO i els respectius controls a diferents punts temporals en la coordenada -0,58 mm segons Bregma. Canvis en la intensitat de senyal permeten detectar hemorràgies, inexistents en els animals analitzats.

### 4. Caracterització del fenotip conductual en ratolins amb deficiència del gen *Ndufs4* en neurones CCK

La deleció constitutiva del gen *Ndufs4* en ratolins Ndufs4KO causa un fenotip molt sever que els condueix a una mort prematura a P50 (Kruse et al. 2008; Quintana et al. 2010). Fins al primer mes de vida, els ratolins Ndufs4KO tenen una conducta similar als controls amb bona mobilitat i socialització. No obstant això, en aquest punt ja han assolit el seu pes màxim i comencen a presentar atàxia, pèrdua de l'equilibri, posició corporal alterada i incapacitat per mantenir-se dalt d'una barra

giratòria (test *rotarod*). Així mateix, manifesten problemes respiratoris, auditiu, visuals, apatia i una reducció en la temperatura corporal ( $\Delta T=2^{\circ}\text{C}$ ). Degut a la reduïda esperança de vida dels ratolins *Ndufs4KO*, fins al moment no s'ha pogut determinar quin paper juga la deficiència del gen d'*Ndufs4* en el còrtex cerebral pel que fa a les alteracions fenotípiques presentades a causa de la seva deleció constitutiva. Per aquest motiu, es va dur a terme un estudi exhaustiu del fenotip dels ratolins *knock-out* condicionals *Cck:Ndufs4cKO* a diferent edats, amb una bateria de tests conductuals motors, sensorials, cognitius i fisiològics.

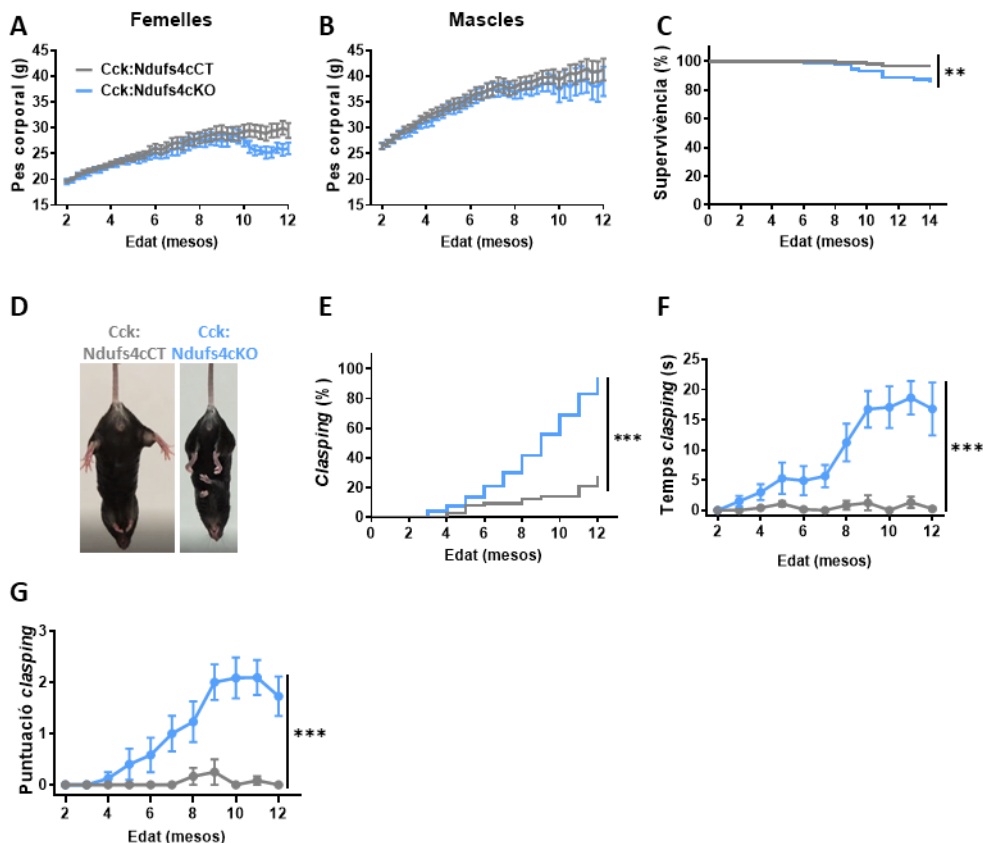
#### **4.1 Reducció en la supervivència i evidència de conducta de *clasp*ing en ratolins *Cck:Ndufs4cKO***

A simple vista els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* no presentaven diferències físiques evidents que permetessin diferenciar-los dels controls, com a mínim fins als 12 mesos d'edat, temps màxim del nostre estudi. D'aquesta manera, els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* exhibien un pes corporal registrat com a l'esperat per la soca *C57BL/6J* tant per femelles com mascles segons el proveïdor de ratolins *The Jackson Laboratory* ("Body Weight Information for *C57BL/6J*" n.d.) (Figura 27A, B). Tot i així, es va detectar una reducció significativa en la taxa de supervivència dels ratolins *Cck:Ndufs4cKO*, amb un 10% de mortalitat als 11 mesos d'edat (Figura 27C).

Per determinar la presència de lesions neurològiques es va procedir a analitzar la conducta de *clasp*ing en animals suspesos per la cua. Aquesta conducta, que s'observa en lesions al cerebel, ganglis basals, medulla espinal o escorça cerebral, entre d'altres (Lalonde and Strazielle 2011), comporta la contracció cap a l'abdomen de les extremitats posteriors (Figura 27D, panell dret), en comparació a la conducta de ratolins control amb les extremitats posteriors completament esteses (Figura 27D, panell esquerre). La conducta de *clasp*ing en els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* es va manifestar de manera significativa (Figura 27E) i amb una major durada (Figura 27F) a partir dels 7-8 mesos d'edat en comparació als ratolins control. Als 12 mesos

## Resultats

d'edat, el 90% dels animals Cck:Ndufs4cKO presentaven *claspings*, mentre que només el 20% dels controls ho feia. Així mateix, la severitat del *claspings* també va augmentar significativament amb l'edat en els ratolins Cck:Ndufs4cKO (Figura 27G).

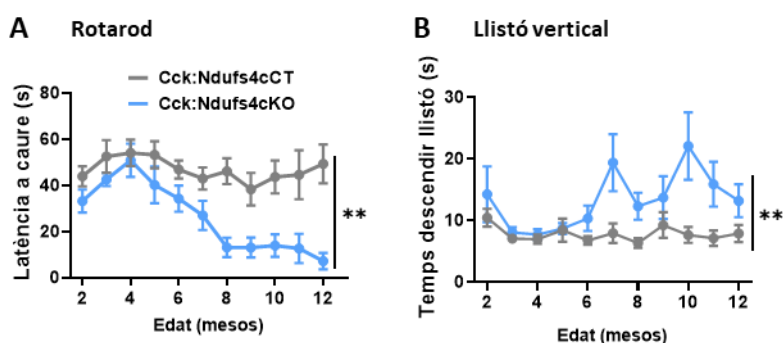


**Figura 27. Manteniment del pes corporal, reducció en la supervivència i aparició de conducta de *claspings* en ratolins Cck:Ndufs4cKO.** **A, B)** Pes corporal de ratolins femelles (A) i mascles (B) (femelles n=7-19; mascles n=6-17). **C)** Corba de supervivència on els ratolins Cck:Ndufs4cKO (n=98) tenen una taxa de supervivència significativament reduïda en comparació als animals control (n=87). **D)** Imatges representatives d'un ratolí Cck:Ndufs4cCT (panell esquerre) amb postura estàndard en suspensió i ratolí Cck:Ndufs4cKO (panell dret) contraient cap a l'abdomen les extremitats posteriors (*claspings*). **E-G)** Aparició de *claspings* (E), durada del *claspings* (F) i severitat del *claspings* (G) en la progressió del fenotip dels ratolins Cck:Ndufs4cKO (n=8-13) i controls (n=12). Els resultats es representen com la mitjana  $\pm$  SEM. Dades dels panells 24C i 24E analitzades estadísticament amb el test Log-rank (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). La resta de dades analitzades estadísticament amb una ANOVA de 2 factors amb mesures repetides (\*\*\*p<0,001).

#### 4.2 Pèrdua de coordinació motora i equilibri en ratolins Cck:Ndufs4cKO

Per tal d'estudiar la coordinació motora i l'equilibri es van col·locar els ratolins en una barra horitzontal giratòria amb acceleració per realitzar el test del *rotarod*, un test validat per evidenciar deteriorament motor en models animals de diferents malalties neurodegeneratives (Kruse et al. 2008; Stover et al. 2015) així com en afectacions en el cerebel i còrtex motor (Shiotsuki et al. 2010; Peters, Liu, and Komiyama 2017). Els resultats varen mostrar que els animals Cck:Ndufs4cKO es mantenien sobre la barra giratòria menys temps que els controls, resultant en una reducció en el temps de latència per caure (Figura 28A). Aquesta diferència va resultar significativa partir dels 8 mesos d'edat.

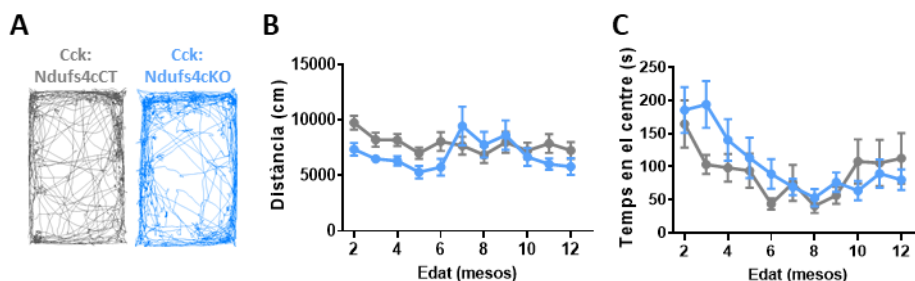
De manera similar al test del *rotarod*, el test del llistó en vertical també identifica alteracions en el còrtex motor i el cerebel, essent molt important tant la coordinació motora com la força de subjecció que exerceixen les extremitats per a una correcta execució del test (Brooks and Dunnett 2009). En concordança amb els resultats obtinguts al test del *rotarod*, els animals Cck:Ndufs4cKO necessitaven significativament més temps que els controls per descendir de la barra vertical a partir dels 7 mesos d'edat (Figura 28B).



**Figura 28. Pèrdua de coordinació motora i equilibri en ratolins Cck:Ndufs4cKO. A)** Latència a caure de l'aparell giratori *rotarod* durant la progressió del fenotip dels ratolins Cck:Ndufs4cKO (n=5-9) i controls (n=9-10). **B)** Temps en descendir d'un llistó vertical de ratolins Cck:Ndufs4cKO (n=9) i controls (n=8-10). Els resultats es representen com la mitjana ± SEM. Dades analitzades estadísticament amb un test ANOVA de 2 factors amb mesures repetides (\*\*p<0,01).

### 4.3 La deficiència del gen *Ndufs4* en neurones CCK no afecta la locomoció

Amb l'objectiu de caracteritzar si la capacitat exploratòria i la locomoció voluntària estaven afectades en els ratolins Cck:Ndufs4cKO es va realitzar el test de camp obert comptabilitzant la distància recorreguda durant 30 minuts en un espai delimitat. En aquest sentit, es va observar que els animals Cck:Ndufs4cKO no presentaven diferències a nivell d'activitat motora comparats amb els ratolins control en tots els temps analitzats (Figura 29A, B). D'altra banda, tampoc es detectaven diferències en el temps que romanien en el centre de la caixa (Figura 29C). Aquesta última dada fa referència a l'estat d'estrès i d'ansietat, ja que generalment els rosegadors amb un comportament d'ansietat tindran preferència pels espais tancats i delimitats, com serien els voltants de la caixa i no pas el seu centre (Bronikowski et al. 2001; Seibenhener and Wooten 2015).



**Figura 29. La deficiència del gen *Ndufs4* en neurones CCK no afecta a la locomoció.** **A)** Recorregut representatiu acumulat durant 30 minuts d'activitat d'un ratolí Cck:Ndufs4cCT (panell esquerre) i ratolí Cck:Ndufs4cKO (panell dret). **B, C)** Distància recorreguda total d'activitat durant 30 minuts (B) i temps en el centre del recinte (C) en ratolins Cck:Ndufs4cKO (n=8) i controls (n=8). Els resultats es representen com la mitjana  $\pm$  SEM. Dades analitzades estadísticament amb un test ANOVA de 2 factors amb mesures repetides.

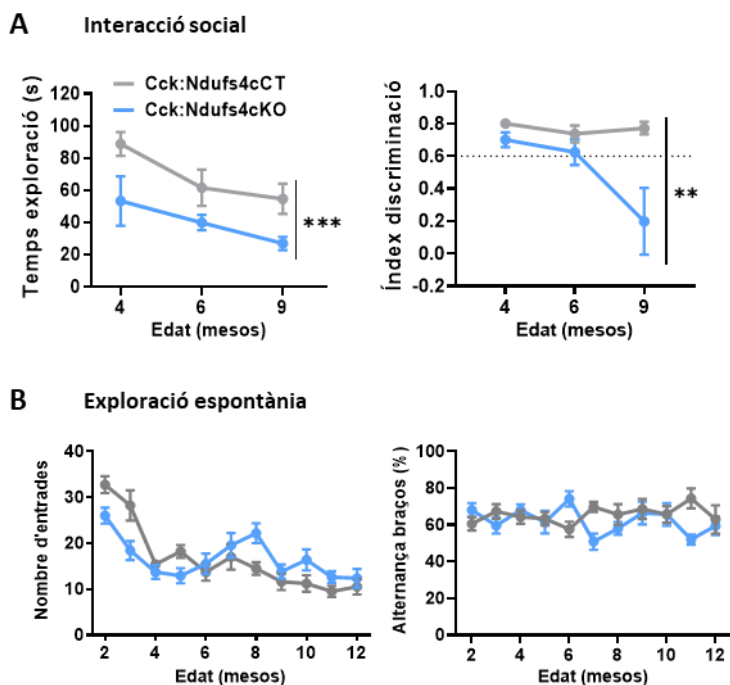
### 4.4 Dèficits de socialització en els ratolins Cck:Ndufs4cKO

La interacció social és un comportament complex controlat per la interacció de diferents àrees cerebrals, com són el còrtex, l'hipocamp, l'estriat i l'amígdala (Blázquez et al. 2019; Ecker, Bookheimer, and Murphy 2015). Per tal d'avaluar la conducta social en els ratolins Cck:Ndufs4cKO, es va dur a terme el test de les 3 cambres realitzat en una caixa amb 3 compartiments amb obertures entre ells.

Aquest test consisteix en analitzar la interacció del ratolí d'estudi amb un ratolí desconegut ubicat en una gàbia amb reixes o bé amb una gàbia buida (Silverman et al. 2010; Takumi et al. 2020). L'índex de discriminació (DI; de *discrimination index*) permet quantificar la sociabilitat dels animals.

El temps d'exploració total dels animals Cck:Ndufs4cKO en les diferents edats analitzades va ser inferior en comparació als controls, considerant conjuntament la interacció amb l'animal desconegut i la interacció amb la gàbia buida (Figura 30A). Tot i així, als 4 i 6 mesos tant els animals control com els Cck:Ndufs4cKO mostraven una preferència per la socialització, interaccionant més amb l'animal desconegut respecte a la gàbia buida, observat per un  $DI > 0,6$  (Figura 30A). Per contra, als 9 mesos d'edat en els animals Cck:Ndufs4cKO s'observava una absència d'interès per interaccionar amb l'animal desconegut en comparació als controls ( $DI < 0,6$ ).

Seguint amb l'estudi de la cognició, es va analitzar l'exploració i la memòria a curt termini amb el test del laberint en "Y" (*Y-maze*), el qual es basa en la tendència natural dels ratolins a explorar un ambient nou i requereix la implicació tant del còrtex parietal prefrontal com de l'hipocamp (Mandillo et al. 2008; Kraeuter, Guest, and Sarnyai 2019b; McHail and Dumas 2020). Els animals Cck:Ndufs4cKO varen entrar un nombre de vegades semblant en els braços del laberint i no varen mostrar diferències en el percentatge d'alternança en comparació al grup control al llarg de tots els mesos analitzats (Figura 30B). Cal destacar que el nombre d'entrades en els braços de l'estructura va anar disminuint a mesura que els animals envellien, però va ser en paral·lel en els dos grups.



**Figura 30. Dèficits de socialització en els ratolins Cck:Ndufs4cKO. A)** Estudi de la interacció social en 3 compartiments amb la presència d'un ratolí nou per explorar amb accés limitat. Temps total d'exploració (animal desconegut + gàbia buida) i índex de discriminació social (DI) dels animals Cck:Ndufs4cKO (n=7-13) i controls (n=12-15) a diferents edats. Valors de DI superiors a 0,6 indiquen preferència per la sociabilitat. **B)** Nombre d'entrades en el laberint en "Y" i alternança entre diferents braços del laberint per animals Cck:Ndufs4cKO (n=8-12) i controls (n=9-10). Els resultats es representen com la mitjana  $\pm$  SEM. Dades analitzades estadísticament amb una ANOVA de 2 factors amb mesures repetides (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

#### 4.5 Els ratolins Cck:Ndufs4cKO no presenten alteracions sensorials

El patró de senyals hiperintenses en les imatges de T2w presentat pels animals Cck:Ndufs4cKO en la RM va posar de manifest que algunes de les àrees corticals sensorials també estaven afectades com a conseqüència de la deficiència mitocondrial. Per aquest motiu, es van caracteritzar diferents paràmetres sensorials fenotípics en els ratolins.

La nocicepció o capacitat per detectar el dolor va ser analitzada aplicant pressió a la base d'una de les extremitats posteriors amb una sèrie de monofilaments de força incremental fins que s'observava una retracció de l'extremitat (test de Von Frey).

Fent servir aquest protocol es va observar que els ratolins Cck:Ndufs4cKO no presentaven canvis nociceptius en comparació als controls en els diferents punts temporals analitzats (Figura 31A).

Per altra banda, es van analitzar les connexions motores centrals i perifèriques mitjançant tests de conducció nerviosa i de potencial motor evocat aplicant estímuls elèctrics a nivell central (estímuls cranials) o perifèrics (estímuls al nervi ciàtic) i enregistrant-ne el patró electrofisiològic en diferents músculs de les extremitats dels ratolins (Figura 31B). Per tal d'obtenir una visió representativa de la conducció nerviosa es van realitzar els tests en animals de 6 mesos, una edat a la que s'observen menys àrees afectades per RM, i a 12-14 mesos com a moment amb afectació estructural del cervell severa.

La conducció nerviosa sensorial perifèrica va ser caracteritzada electrofisiològicament aplicant un estímulo en el nervi ciàtic i enregistrant-ne el potencial d'acció nerviós compost (CNAP) en el quart dit de l'extremitat proper als nervis digitals, observant-se que no hi havia diferències en la latència (Figura 31C) ni en l'amplitud (Figura 31D) del CNAP registrat entre els dos grups d'animals. Tot i així, la latència del potencial d'acció va disminuir significativament a mesura que els animals envellien independentment del genotip.

De manera similar, la conducció nerviosa motora perifèrica va ser analitzada aplicant un estímulo en el nervi ciàtic i enregistrant-ne el potencial d'acció motor compost (CMAP) en dos músculs de les extremitats posteriors: múscul tibial anterior (TA), més proximal, i múscul plantar (PL), més distal. En aquest cas, el CMAP presentat pels animals Cck:Ndufs4cKO tampoc mostrava diferències en la latència ni l'amplitud en comparació als controls (Figura 31E-H) però sí que disminuïen significativament amb l'edat en els dos grups analitzats (Figura 31E-G).

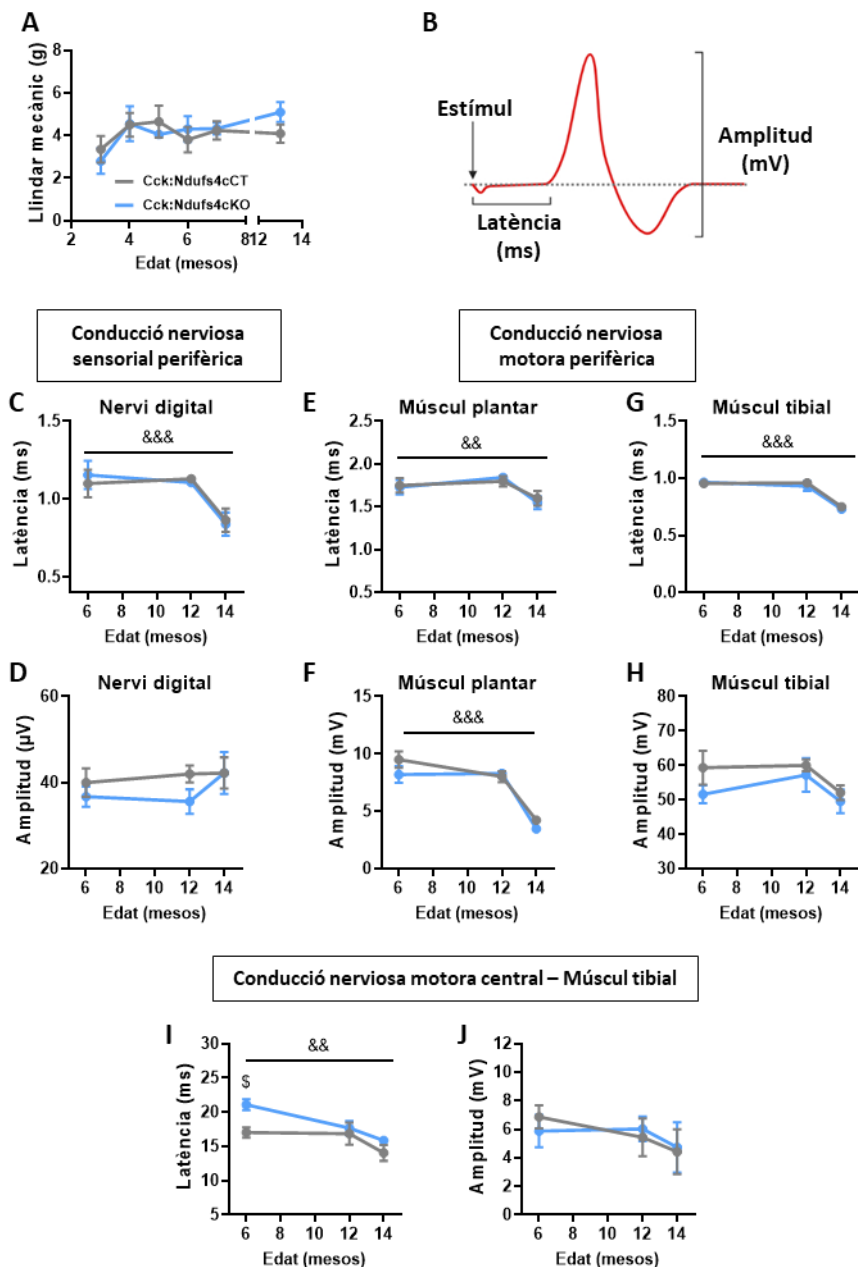
Per últim, es va caracteritzar la conducció motora central amb una estimulació cranial i posterior enregistrament del potencial motor evocat (MEP) en el múscul TA



## Resultats

d'una extremitat. Als 6 mesos d'edat, els ratolins Cck:Ndufs4cKO mostraven un augment significatiu en la latència del MEP en comparació al grup control (Figura 31I), alhora que es va detectar una disminució a mesura que envellien en els dos grups d'estudi. Pel contrari, l'amplitud del MEP no presentava diferències entre els genotips (Figura 31J).

En conjunt, aquestes dades suggerien una absència d'afectacions en el sistema sensorial dels ratolins Cck:Ndufs4cKO, malgrat presentaven alteracions en les àrees neuroanatòmiques sensorials en els anàlisis de RM.



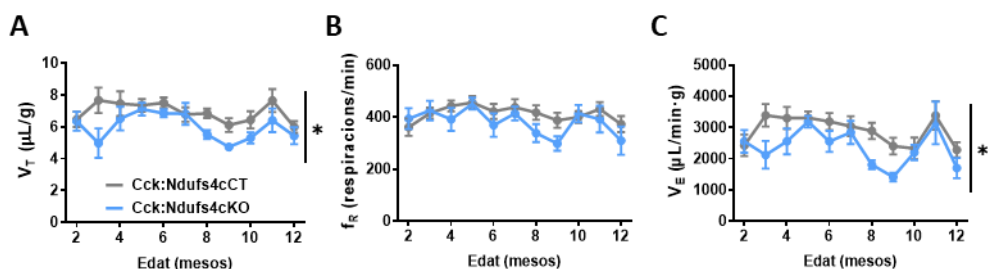
**Figura 31. Els ratolins Cck:Ndufs4cKO no presenten alteracions sensorials.** **A)** Quantificació de la força aplicada en el palmell de l'extremitat posterior necessària per observar una retracció de l'extremitat en resposta a un estímul en ratolins Cck:Ndufs4cKO (n=2-7) i controls (n=2-8). **B)** Representació esquemàtica del potencial d'acció compost després d'un estímul. **C-H)** Latència en del potencial d'acció (C, E, G) i amplitud total (D, F, H) després d'estimular el nervi ciàtic i registrar la conducció nerviosa sensorial en els nervis digitals (C, D) i conducció nerviosa motora en els músculs plantars (E, F) i els músculs tibials anteriors (G, H) de ratolins Cck:Ndufs4cKO (n=4-5) i controls (n=3-4).

## Resultats

I, J) Latència de l'ona M (I) i amplitud total de l'ona M (J) després d'una estimulació transcranial i posterior enregistrament del MEP en els músculs tibials anteriors en ratolins Cck:Ndufs4cKO (n=4-5) i controls (n=3-4). Els resultats es representen com la mitjana  $\pm$  SEM. Dades analitzades estadísticament amb una ANOVA de 2 factors amb mesures repetides i comparacions múltiples de Sidak ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  edat;  $p < 0,05$  post-hoc entre genotips).

### 4.6 Alteracions en el patró respiratori dels ratolins Cck:Ndufs4cKO

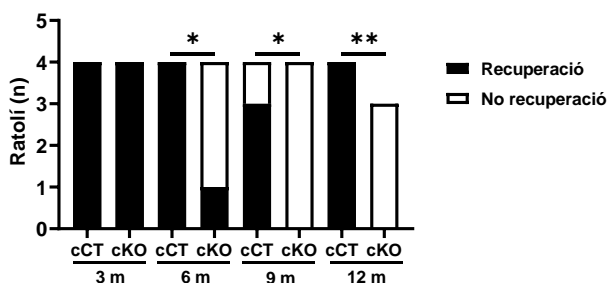
La deficiència del gen *Ndufs4* està associada a l'aparició de dèficits respiratoris en ratolins (Quintana et al 2012). Per tal d'avaluar la possible contribució de les neurones CCK en aquesta resposta es va analitzar la funció respiratòria amb la tècnica de la pletismografia (Lim et al. 2014; Prada-Dacasa et al. 2020), que va permetre caracteritzar que els animals Cck:Ndufs4cKO presentaven una reducció significativa en el volum corrent ( $V_T$ ; volum d'aire inspirat i expirat en un cicle normal de respiració) al llarg dels mesos (Figura 32A), sense que la freqüència respiratòria ( $f_R$ ) estigués afectada (Figura 32B). Aquests resultats suggereixen la presència de respiracions menys profundes a cada cicle, com pot observar-se amb la disminució significativa del volum per minut ( $V_E$ ; mesura de volum d'aire inspirat i expirat per minut) en els animals Cck:Ndufs4cKO al llarg dels temps analitzats (Figura 32C).



**Figura 32. Alteracions en el patró respiratori dels ratolins Cck:Ndufs4cKO. A-C)** Paràmetres respiratoris de volum corrent (A), freqüència respiratòria (B) i volum per minut (C) en animals Cck:Ndufs4cKO (n=7-10) i controls (n=10-14) al llarg dels mesos. Els resultats es representen com la mitjana  $\pm$  SEM. Dades analitzades estadísticament amb un test ANOVA de 2 factors amb mesures repetides (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.7 Conseqüències fatals en anestesiatar ratolins Cck:Ndufs4cKO

Prèviament, s'ha descrit que els ratolins Ndufs4KO mostren hipersensibilitat als anestèsics volàtils (isoflurà i halotà) i al propofol (no-volàtil) (Quintana, Morgan, et al. 2012), alteració comú en pacients amb síndrome de Leigh i en especial amb deficiència del CI (Morgan, Hoppel, and Sedensky 2002). Tal i com s'ha comentat anteriorment, els estudis de RM requerien anestesiatar els ratolins durant 2h amb isoflurà. Si bé durant tot el període d'obtenció d'imatges de RM, i les hores posteriors, els ratolins Cck:Ndufs4cKO joves mantenien un ritme respiratori normal, a partir dels 6 mesos d'edat, aquets ratolins no recuperaven una activitat normal, morint en la majoria dels casos en les 12-24h següents a l'anestèsia. Aquestes dades suggereixen una possible sensibilitat a l'anestèsic volàtil isoflurà dels animals Cck:Ndufs4cKO a partir d'una determinada edat (Figura 33).



**Figura 33. Conseqüències fatals en anestesiatar els ratolins Cck:Ndufs4cKO a partir dels 6 mesos d'edat.** Freqüència de supervivència o no recuperació dels ratolins Cck:Ndufs4cKO i controls després de 2h d'exposició a l'anestèsic volàtil isoflurà a diferents edats. Dades analitzades estadísticament amb  $\chi^2$  amb 1 grau de llibertat (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) (cCT: Cck:Ndufs4cCT; cKO: Cck:Ndufs4cKO; m: mesos).

## 5. Neuroinflamació cortical severa en la disfunció del gen *Ndufs4* en neurones CCK

Tal com s'ha mencionat anteriorment, la deficiència del gen *Ndufs4* en ratolins Ndufs4KO desencadena l'aparició de neuroinflamació en àrees cerebrals característiques (Quintana et al. 2010). Per tal de determinar el possible estat inflamatori causat per la deficiència del gen *Ndufs4* específicament en neurones CCK,

## Resultats

es van realitzar anàlisis d'immunofluorescència amb anticossos contra GFAP, marcador d'astròcits, i Iba1, marcador de micròglia, en talls seqüencials de cervells d'animals Cck:Ndufs4cKO i els seus respectius controls a 3, 6, 9 i 12 mesos d'edat.

Els animals Cck:Ndufs4cCT no presentaven neuroinflamació a nivell cortical en cap edat de les analitzades, exhibint un marcatge basal de GFAP i Iba1 sense presència de reactivitat glial (Figura 34A-C). Per contra, la disfunció mitocondrial específica en les neurones CCK va generar un patró neuroinflamatori sever de manera bilateral i progressiva al còrtex parietal dels ratolins Cck:Ndufs4cKO (Figura 34D-O). Tot i mostrar una important variabilitat entre animals, en un estadi inicial (3 mesos), la micròglia mostrava una morfologia no reactiva i no es van detectar astròcits ramificats en el còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO (Figura 34D-F). Als 6 mesos, es va observar un gran augment en el nombre d'astròcit hipertròfics de manera uniforme i l'aparició de cèl·lules de la micròglia reactives a nivell cortical (Figura 34G-I). Posteriorment, als 9 mesos, el còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO presentava una àrea limitada per astrogliosis severa en forma de cicatriu glial amb ramificació dels astròcits envoltant una gran concentració de cèl·lules microglials reactives (Figura 34J-L). A nivell anatòmic, l'afectació es localitzava en diferents àrees corticals i subcorticals (Taula 20).

**Taula 20. Llistat de les àrees cerebrals que presentaven neuroinflamació en els animals Cck:Ndufs4cKO a partir dels 9 mesos d'edat.**

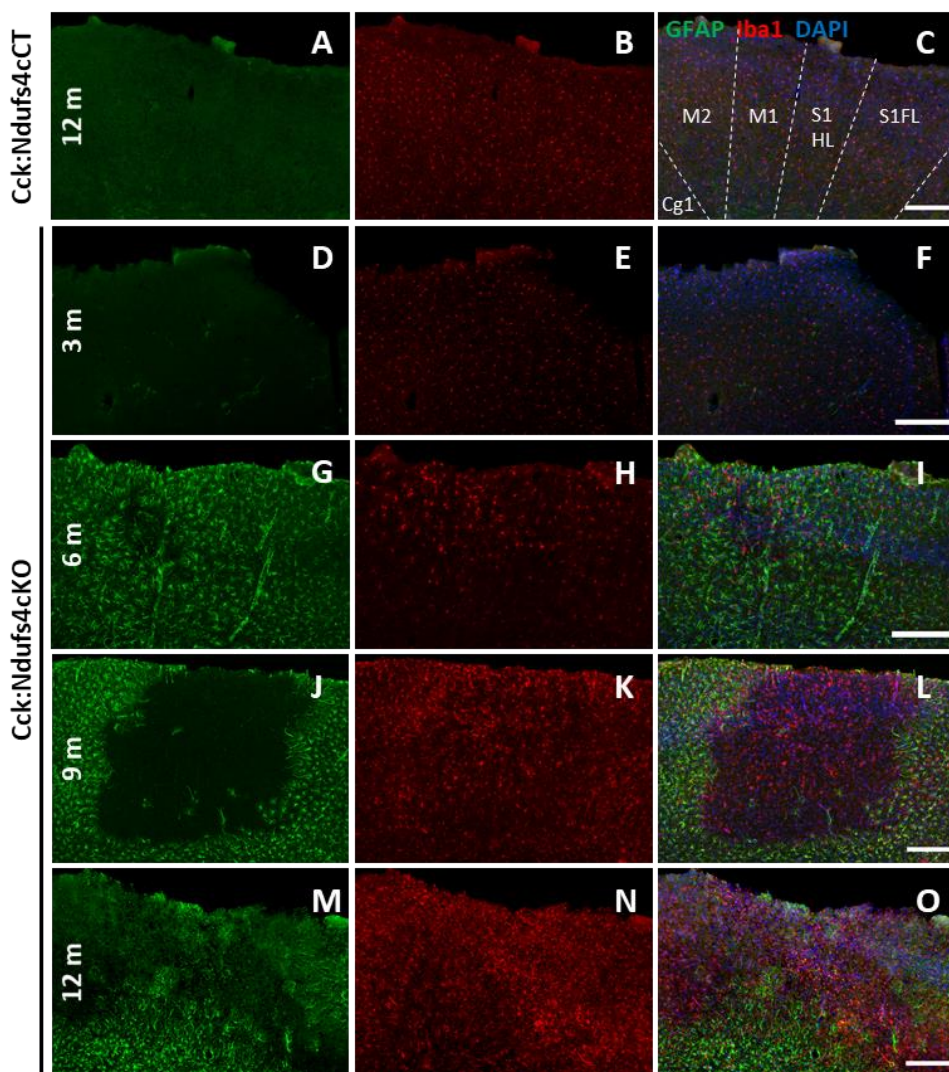
Abreviació	Nom àrea cerebral
FrA	Còrtex frontal associatiu
CA1, CA2, CA3	<i>Cornu Ammonis</i> 1, 2 i 3 de l'hipocamp
Cg1	Còrtex cingulat, àrea 1
M1	Còrtex motor primari
M2	Còrtex motor secundari
MD	Nucli talàmic mediodorsal
Po	Grup talàmic posterior
S1BF	Còrtex somatosensorial primari, zona de barrils
S1DZ	Còrtex somatosensorial primari, zona disgranular
S1FL	Còrtex somatosensorial primari, zona extremitats anteriors
S1HL	Còrtex somatosensorial primari, zona extremitats posteriors
S1Tr	Còrtex somatosensorial primari, zona del tronc

S1ULp	Còrtex somatosensorial primari, zona del llavi superior
VP	Nucli talàmic ventrotemporal
VL	Nucli talàmic ventrotemporal

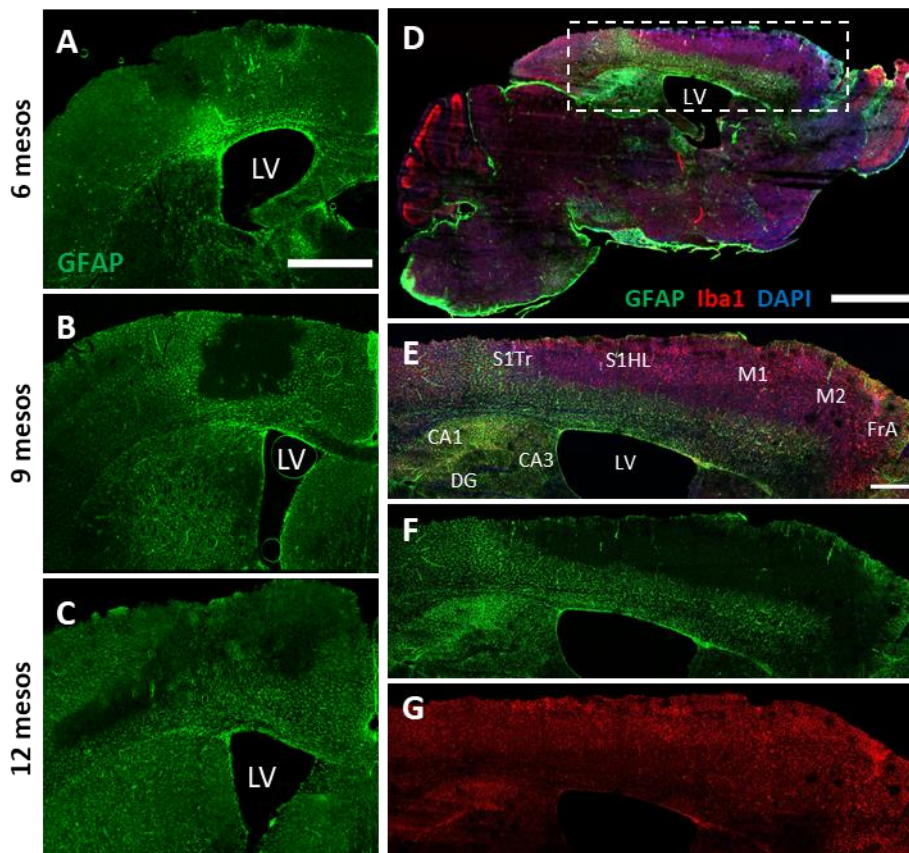
Als 12 mesos d'edat el marcatge dels astròcits s'estenia de manera lateral per tot el còrtex afectant més àrees somatosensorials (S1FL, S1DZ, S1BF, S1ULp) en els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* (Figura 34M-O). Així mateix, s'observava la presència generalitzada de micròglia amb morfologia reactiva i hipertròfica per tot el còrtex (Figura 34N).

La cicatriu glial dels astròcits s'iniciava de manera aïllada en el còrtex motor primari als 6 mesos d'edat en els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* i anava augmentant de manera progressiva afectant més àrees corticals a mesura que avançava la patologia en els animals (Figura 35A-C). Així mateix, en un tall sagital de cervell de ratolí *Cck:Ndufs4cKO* s'observaven les diferents estructures neuroanatomiques abastades per la cicatriu glial (Figura 35D-G).

Per altra banda, l'expressió del neuropèptid CCK en d'altres àrees cerebrals no corticals va motivar l'anàlisi del seu estat neuroinflamatori (Beinfeld et al. 1981; Lein et al. 2007; Taniguchi et al. 2011). En aquest sentit, l'hipocamp dels ratolins *Cck:Ndufs4cKO* mostrava un increment dels astròcits reactius així com un alteració en les seves estructures (Figura 36A-D), possiblement motivada per l'engrandiment dels ventricles observat als 9 mesos d'edat (apartat 3.1, Figura 19F). Contràriament, el cerebel, àrea amb expressió de *Cck* en les cèl·lules de Purkinje, presentava absència de neuroinflamació en els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* (Figura 36E-H). Per últim, diferents nuclis talàmics exhibien reactivitat astrocitària en els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* (Figura 36I, J), presumiblement degut a l'expressió de *Cck* en l'àrea neuronal juntament amb la possible alteració de les projeccions cortico-talàmiques (Harris and Shepherd 2015).

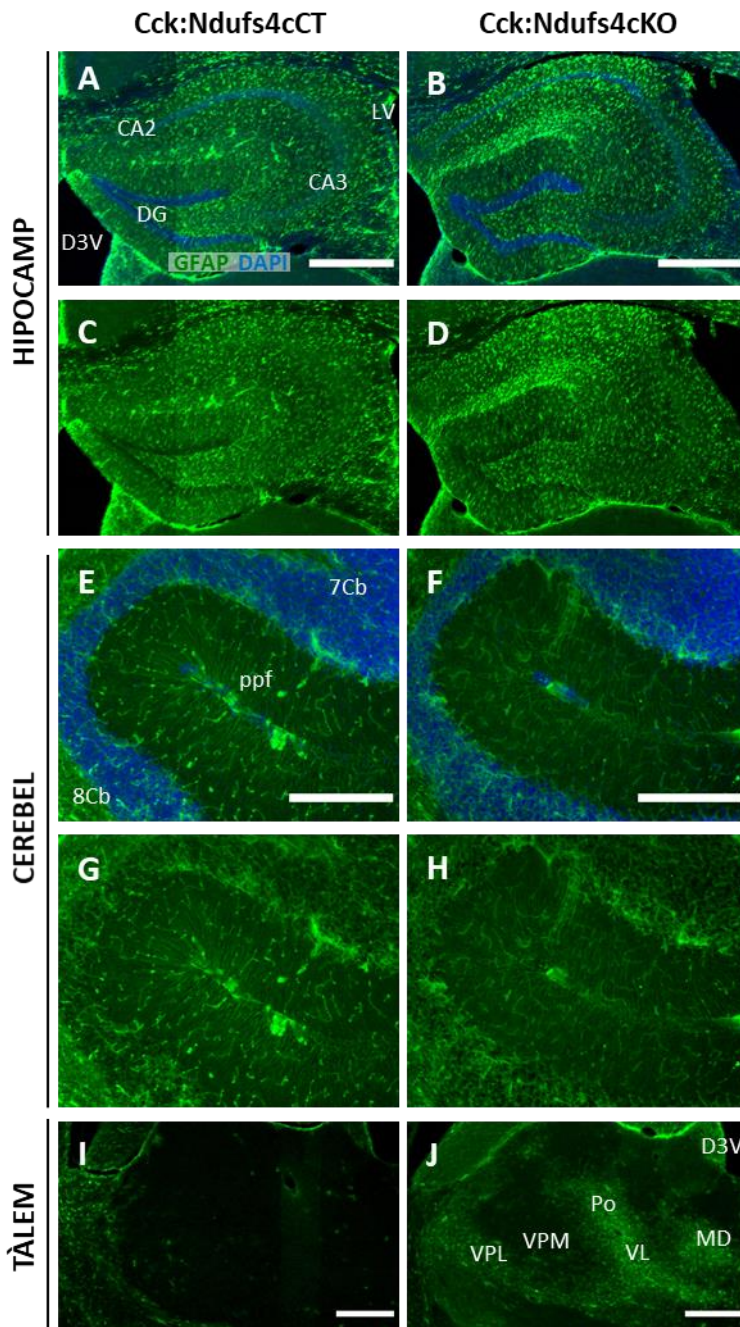


**Figura 34. Progressió de la neuroinflamació cortical en ratolins Cck:Ndufs4cKO.** A-O) Marcatge dels astròcits amb GFAP (A, D, G, J, M), micròglia amb Iba1 (B, E, H, K, N) i nuclis cel·lulars amb DAPI (C, F, I, L, O) en animals control de 12 mesos d'edat (A-C) i animals Cck:Ndufs4cKO de 3 mesos (D-F), 6 mesos (G-I), 9 mesos (J-L) i 12 mesos (M-O) d'edat. Imatges corresponents a la coordenada Bregma 0,02 mm. (Cg1: còrtex cingulat àrea 1; m: mesos; M2: còrtex motor secundari; M1: còrtex motor primari; S1HL: còrtex somatosensorial primari, extremitats posteriors; S1FL: còrtex somatosensorial primari, extremitats anteriors) (n=4/edat i genotip). Escala = 250µm.



**Figura 35. Progressió de l'astrogliosi en el còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO.** A-C) Immunofluorescència del marcador astrocitari GFAP en talls coronals d'animals Cck:Ndufs4cKO de 6 mesos (A), 9 mesos (B) i 12 mesos (C) d'edat. Imatges corresponents a la coordenada Bregma 0,02 mm. D-G) Tall cerebral sagital (D) de ratolí Cck:Ndufs4cKO de 9 mesos d'edat amb marcatge dels astròcits amb GFAP (D, F), micròglia amb Iba1 (D, G) i nuclis cel·lulars amb DAPI (D). Requadre puntejat en el panell D correspon a magnificació panells E-G. Imatges corresponents a la coordenada Lateral 1,32 mm. (CA1, CA3: *Cornu Ammonis* 1 i 3 de l'hipocamp; DG: gir dentat; FrA: còrtex frontal associatiu; LV: ventricle lateral; M1: còrtex motor primari; M2: còrtex motor secundari; S1Tr: còrtex somatosensorial del tron; S1HL: còrtex somatosensorial de les extremitats posteriors). Escala (A) = 1mm; escala (D) = 2mm; escala (E) = 500µm.





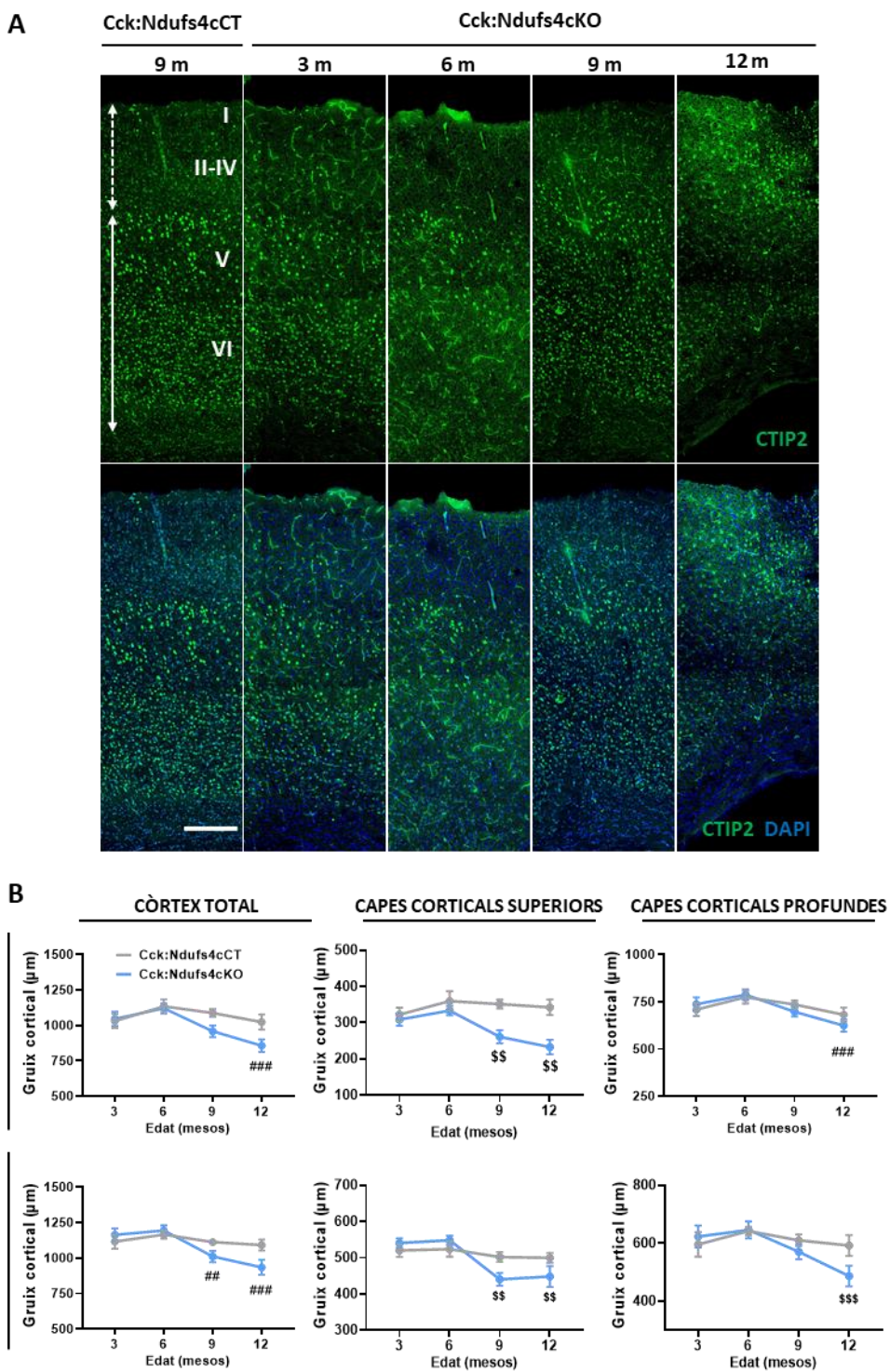
**Figura 36. Hipocamp i tàlem presenten reactivitat astrocitària amb absència en el cerebel en ratolins *Cck:Ndufs4cKO* als 9 mesos d'edat. A-J) Marcatge dels astròcits amb GFAP i nuclis cel·lulars amb DAPI (A, B, E, F) en animals control (A, C, E, G, I) i animals *Cck:Ndufs4cKO* (B, D, F, H, J) en l'hipocamp (A-D), el cerebel (E-H) i el tàlem (I, J). (7Cb, 8Cb: setè i vuitè lòbul del cerebel; CA2, CA3: *Cornu Ammonis* 2 i 3 de l'hipocamp; D3V: tercer ventricle; DG: gir dentat; LV: ventricle lateral; MD: nucli talàmic mediodorsal; Po: grup talàmic posterior; ppf: fissura prepiramidal; VL: nucli talàmic ventrolateral; VPL: nucli talàmic ventral posterolateral; VPM: nucli talàmic ventral posteromedial) (n=4/genotip). Escala (A, B, I, J) = 500µm; escala (E, F) = 250µm.**

## **6. Reducció de les capes corticals superiors en ratolins Cck:Ndufs4cKO**

La severa neuroinflamació present en el còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO a partir dels 6-9 mesos d'edat així com les alteracions anatòmiques detectades per RM van motivar l'estudi de la distribució de les diferents capes corticals. Actualment, existeixen diverses proteïnes amb un patró d'expressió específic de capa o capes corticals en ratolins (Hevner 2007) com el factor de transcripció CTIP2 que s'expressa de manera específica en les capes corticals profundes (capes 5 i 6) del còrtex en ratolins adults (Arlotta et al. 2005) (Figura 37A).

L'anàlisi del marcatge de CTIP2 en el còrtex parietal a diferents edats en talls de cervell de ratolins Cck:Ndufs4cKO va revelar una disminució significativa de les capes corticals superiors (capes 1-4) als 9 i 12 mesos d'edat en comparació als controls. A més a més, en l'últim temps analitzat també es va registrar una reducció de les capes corticals profundes en comparació als 3 mesos, contribuint conjuntament a un menor gruix total del còrtex en aquesta edat (Figura 37B).

Paral·lelament, la quantificació d'una zona més allunyada del focus de la neuroinflamació, còrtex temporal, va posar de manifest que el còrtex també era més prim en els animals Cck:Ndufs4cKO als 9 i 12 mesos respecte als valors dels 3 mesos (Figura 37B). Addicionalment, es va detectar una disminució significativa del gruix de les capes corticals superiors als 9 i 12 mesos en els ratolins Cck:Ndufs4cKO, mentre que en les capes profundes la reducció només va ser evident en l'últim temps analitzat, una edat en la que aquests animals presentaven una distribució anòmala del marcatge de CTIP2 possiblement associada a la severitat de la neuroinflamació.



**Figura 37. Reducció de les capes corticals superiors en ratolins Cck:Ndufs4cKO d'avançada edat.**

**A)** Immunofluorescència de les capes corticals profundes (5 i 6) amb el marcador CTIP2 en ratolins Cck:Ndufs4cKO a diferents edats i el respectiu control en el còrtex parietal. Gruix de les capes corticals superiors (negatives per Ctip2) indicat amb fletxa discontinua i gruix de les capes corticals profundes (positives per Ctip2) indicat per fletxa continua. Nuclis cel·lulars marcats amb DAPI. Imatges corresponents al còrtex motor (M1 i M2). Escala = 200µm. **B)** Quantificació del gruix total cortical, capes corticals superiors i profundes en el còrtex parietal i temporal a diferents edats en animals Cck:Ndufs4cKO (n=3-4) i controls (n=3). Els resultats es representen com la mitjana ± SEM. Dades analitzades estadísticament amb un test ANOVA de 2 factors amb mesures repetides (\$\$p<0,01; \$\$\$p<0,001 respecte genotip; ##p<0,01; ###p<0,001 respecte 3 mesos; p<0,05 genotip x edat, en tots els gràfics a excepció de capes profundes còrtex parietal).

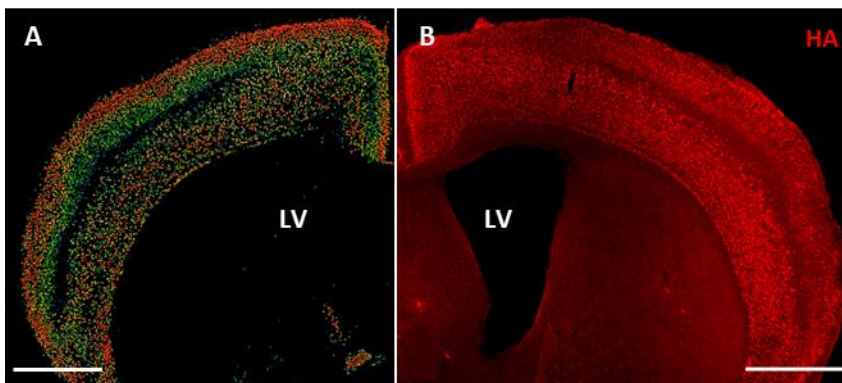
## **7. Alteració en la distribució cortical de les neurones CCK deficientes en el gen *Ndufs4***

El patró neuroinflamatori i la disminució del gruix cortical present en els ratolins Cck:Ndufs4cKO ens va fer hipotetitzar que la quantitat o la distribució cortical de les neurones CCK podria estar afectada per l'absència de la subunitat NDUF54. Per tal d'identificar les neurones CCK, i davant de la dificultat per obtenir marcatge somàtic dels neuropèptids degut al seu transport axonal (Corbière et al. 2019), es va generar una nova línia de ratolí que expressava, de manera Cre dependent, un epítip d'hemaglutinina (HA) als ribosomes de les neurones CCK (ratolí RiboTag, Sanz et al., 2009). Aquesta aproximació va permetre el marcatge de les neurones CCK de manera indirecta amb anticossos contra HA.

En aquest sentit, l'anàlisi per immunofluorescència de talls cerebrals d'animals Cck:RiboTag:Ndufs4cKO i Cck:RiboTag:Ndufs4cCT a 6, 9 i 12 mesos d'edat va permetre identificar que la distribució de les neurones CCK marcades amb l'epítip HA en el cervell d'animals Cck:RiboTag:Ndufs4cCT es corresponia al marcatge descrit en la bibliografia mitjançant hibridació *in situ* (Lein et al. 2007) (Figura 38 i 39A-F), validant l'ús d'aquesta tecnologia per identificar de manera específica la població de neurones CCK. D'altra banda, aquesta aproximació va possibilitar determinar que els ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO de 6 mesos d'edat presentaven alteracions en la distribució de les neurones CCK limitades a les àrees corticals motores (M1 i M2) (Figura 39G-L). Aquestes alteracions es veien agreujades als 9 mesos, amb una major

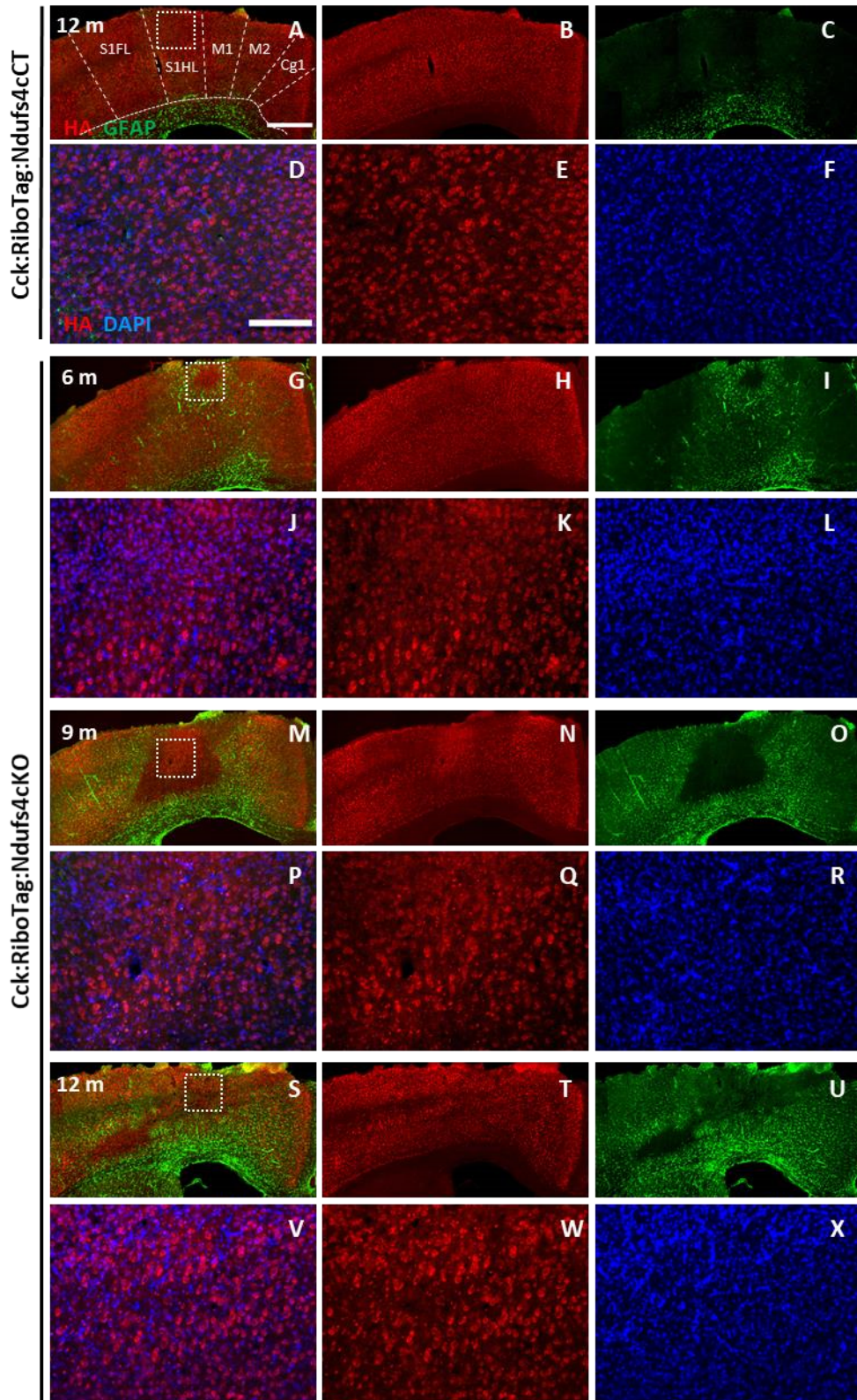
## Resultats

afectació cortical, conjuntament amb canvis en la morfologia i en el volum ribosomal de les neurones CCK en el focus neuroinflamatori dels animals Cck:RiboTag:Ndufs4cKO (Figura 39M-R). Posteriorment, als 12 mesos, la distribució de les neurones CCK corticals es va veure afectada de manera global en els ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO, més enllà de les àrees amb neuroinflamació evident (Figura 39S-X i 40).



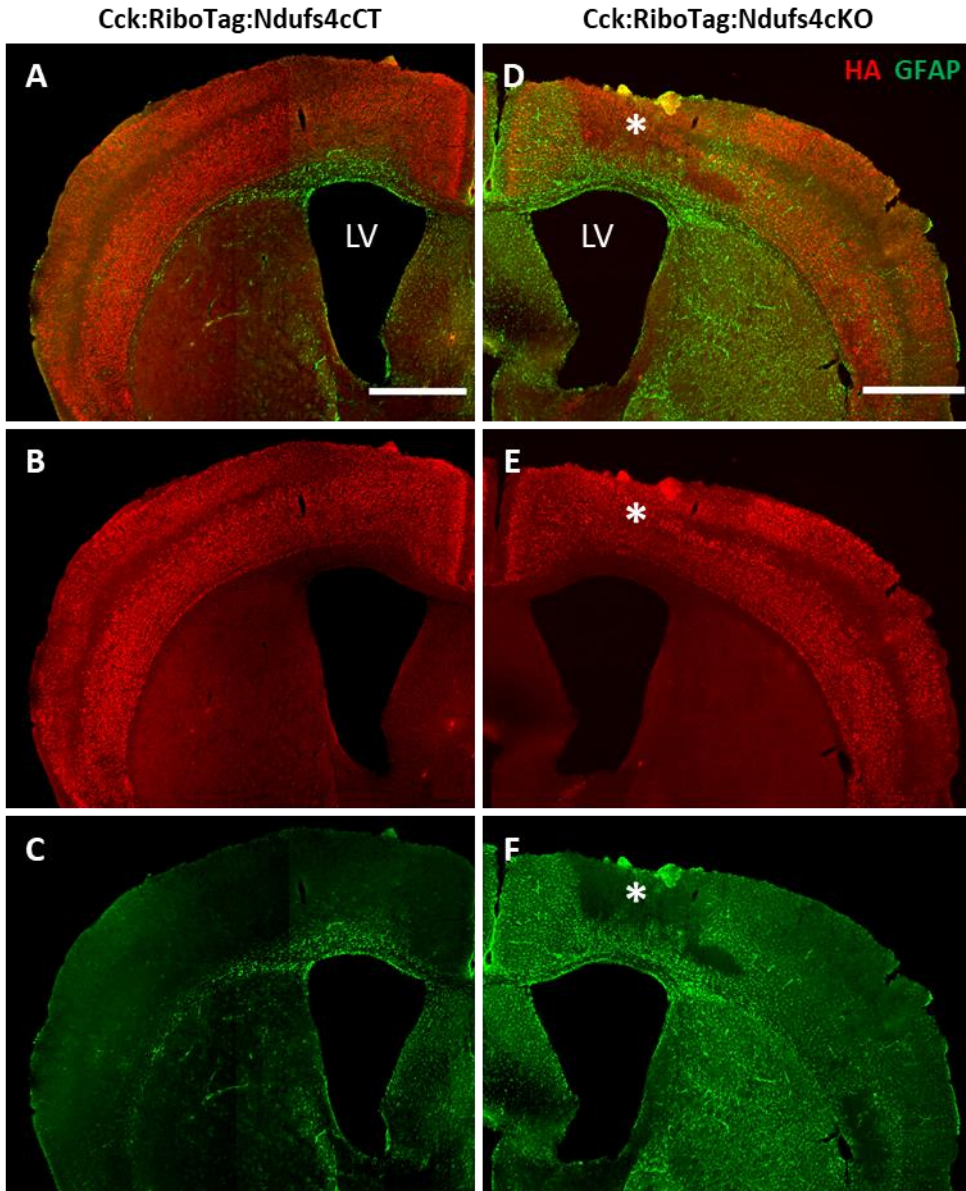
**Figura 38. Localització de neurones CCK en el còrtex d'un ratolí adult. A)** Expressió del transcrit *Cck* marcat per hibridació *in situ* (pseudocolor). Imatge modificada de l'*Allen Mouse Brain Atlas* (Lein et al 2007). **B)** Marcatge de les neurones CCK mitjançant l'epítot HA per immunofluorescència en un animal Cck:RiboTag:Ndufs4cCT de 12 mesos d'edat. Imatges corresponents a la coordenada Bregma -0,10 mm. (LV: ventricle lateral). Escala = 1 mm.





## Resultats

**Figura 39. Alteració en la distribució cortical de les neurones CCK de ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO. A-X)** Marcatge de les neurones CCK mitjançant immunofluorescència contra l'epítot HA (B, E, H, K, N, Q, T, W), dels astròcits amb un anticòs contra GFAP (C, I, O, U) i dels nuclis cel·lulars amb el colorant DAPI (F, L, R, X) en animals control de 12 mesos d'edat (A-F) i animals Cck:RiboTag:Ndufs4cKO de 6 mesos (G-L), 9 mesos (M-R) i 12 mesos (S-X) d'edat. Imatges corresponents a la coordenada Bregma -0,22 mm. (Cg1: còrtex cingulat àrea 1; M2: còrtex motor secundari; M1: còrtex motor primari; S1HL: còrtex somatosensorial primari, extremitats posteriors; S1FL: còrtex somatosensorial primari, extremitats anteriors) (n=4/edat i genotip). Escala (A-C, G-I, M-O, S-U) = 500 µm; escala (D-F, J-L, P-R, V-X) = 150 µm.



**Figura 40. Distribució de les neurones CCK corticals en ratolí Cck:RiboTag:Ndufs4cKO i control.** Immunofluorescència contra HA en animal de 12 mesos d'edat del grup control (A-C) i en animal Cck:RiboTag:Ndufs4cKO (D-F). Marcatge de les neurones CCK HA-positives (B, E) i dels astròcits amb anticòs contra GFAP (C, F). Àrea amb major afectació indicada amb asterisc. Imatges corresponents a la coordenada Bregma -0,10 mm. (LV: ventriclle lateral). Escala = 1 mm.



## **8. Estudi del perfil transcripcional cortical de neurones CCK en ratolins Cck:Ndufs4cKO**

Per tal d'identificar si la major vulnerabilitat de les neurones corticals CCK a la deficiència del gen *Ndufs4* es devia a alteracions transcripcionals específiques, es va procedir a emprar la tecnologia RiboTag, un mètode que permet obtenir per una banda una mostra representativa de l'RNA total de l'àrea disseccionada (còrtex parietal o temporal) o *Input*, i per l'altra, una mostra representativa del mRNA associat a ribosoma de la població neuronal d'interès o immunoprecipitat (IP) (Sanz et al. 2009). Aquesta última mostra és l'emprada per realitzar l'anàlisi del traductoma citosòlic amb resolució de tipus cel·lular.

Per a tal de dur a terme l'anàlisi RiboTag, es van obtenir mostres de dues àrees corticals en ratolins control (Cck:RiboTag:Ndufs4cCT) i amb deficiència del gen *Ndufs4* (Cck:RiboTag:Ndufs4cKO). En base als nostres estudis histològics, es va determinar que el punt temporal de 6 mesos era l'òptim per fer l'estudi transcripcional, al ser el punt inicial de la neuroinflamació i on anticipàvem una absència, o menor presència, de mort cel·lular i pèrdua neuronal. Per una banda es va emprar el còrtex parietal, considerat la zona on s'inicia la neuroinflamació, i per altra el còrtex temporal, com a zona cortical no afectada de manera primària. Cal destacar que tant en el còrtex parietal com en el temporal hi ha una gran presència de neurones CCK (Figura 38).

### **8.1 Validació de la tecnologia RiboTag per l'aïllament del traductoma en neurones CCK corticals amb deficiència mitocondrial**

Amb l'objectiu de determinar el nivell d'enriquiment per la població CCK en les mostres immunoprecipitades dels assaigs RiboTag, que contenen els mRNA associat a ribosomes de les cèl·lules que expressen la recombinasa Cre del còrtex de ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cCT i Cck:RiboTag:Ndufs4cKO, es va realitzar l'anàlisi per qRT-PCR de transcrits específics de la població neuronal colecistocinina (*Cck*), així com de

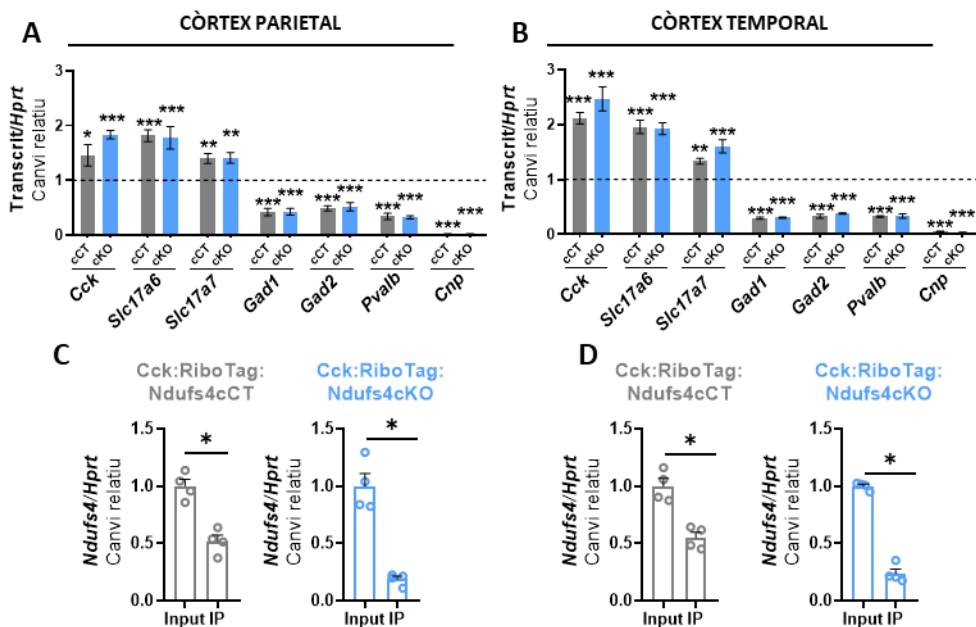
marcadors neuronals per neurones glutamatèrgiques (*Slc17a7* i *Slc16a6*), GABAèrgiques (*Gad2* i *Gad2*), parvalbúmina (*Pvalb*) i d'altres tipus cel·lulars, com els oligodendròcits (*Cnp*) (Figura 41A, B). Es van escollir els transcrits glutamatèrgics i GABAèrgics per tal de representar les dues grans poblacions neuronals excitatòries i inhibidòries, respectivament, el transcrit *Pvalb* com a marcador d'una de les poblacions d'interneurons més abundants en el còrtex i els oligodendròcits com a marcador de població no neuronal (Whissell et al. 2015; Yuste et al. 2020).

En cada cas les mostres de mRNA immunoprecipitat es van comparar els nivells d'expressió amb les mostres *Input*. Així doncs, valors d'expressió superiors a 1 en les mostres IP indiquen un enriquiment del transcrit en la població immunoprecipitada, mentre que valors inferiors a 1 n'indiquen una depleció. Els resultats van confirmar que la població immunoprecipitada presentava un enriquiment pels transcrits *Cck* i van posar de manifest un enriquiment pels transcrits glutamatèrgics (*Slc17a7* i *Slc16a6*), concretament amb uns nivells d'expressió 1,5-1,8 vegades superior a l'*Input* en el còrtex parietal pel transcrit *Cck* (Figura 41A) i fins a 2 vegades superior en el còrtex temporal (Figura 41B). Paral·lelament, es va detectar una depleció de transcrits GABAèrgics, *Pvalb* i *Cnp* en les mostres IP respecte a l'RNA total (*Input*) tant en el còrtex parietal com temporal (Figura 41A, B). Per tant, aquests resultats van demostrar que la immunoprecipitació del mRNA associat a ribosomes-HA permetia l'anàlisi del perfil d'expressió gènica de la població neuronal positiva per colecistocinina, i que a més, suggeria que aquesta població presentava un perfil glutamatèrgic enriquit i empobrit GABAèrgicment i per parvalbúmina.

Seguidament, per tal de determinar l'afectació mitocondrial es van caracteritzar els nivells d'expressió del transcrit *Ndufs4* per qRT-PCR tant en l'àrea analitzada (*Input*) com en la població neuronal CCK (IP) (Figura 41C, D). Es va detectar una disminució al voltant del 80% en l'expressió d'aquest transcrit en la fracció immunoprecipitada de les mostres de ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO, mentre que les mostres control van presentar una depleció del 50% del transcrit *Ndufs4*, tal com era d'esperar en

## Resultats

ratolins heterozigots portadors d'un al·lel *wild type* i un al·lel amb deleció del gen *Ndufs4* (*lox/+*) (Figura 41C, D). Els canvis descrits es van donar amb un patró semblant tant en el còrtex parietal com temporal, confirmant la correcta deleció del gen *Ndufs4* i la purificació de transcrits de la població neuronal CCK de manera específica.



**Figura 41. Validació de l'assaig RiboTag per a l'aïllament del traductoma de neurones CCK en el còrtex parietal i temporal d'animals Cck:RiboTag:Ndufs4cKO i controls a 6 mesos d'edat. A, B)** Enriquiment dels transcrits expressats en neurones CCK (*Cck*), glutamatèrgiques (*Slc17a7* i *Slc17a6*), GABAèrgiques (*Gad1* i *Gad2*), amb parvalbúmina (*Pvalb*) i oligodendròcits (*Cnp*) mitjançant la tecnologia RiboTag en el còrtex parietal (A) i temporal (B). Les dades IP han estat normalitzades respecte l'Input i el gen normalitzador *Hprt*. Valors superiors a 1 indiquen un enriquiment del transcrit en les neurones CCK i valors inferiors a 1 n'indiquen una depleció. Dades analitzades amb un t-test per cada transcrit respecte cada Input (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). **C, D)** Canvi relatiu en l'expressió d'*Ndufs4* normalitzat per *Hprt* a nivell tissular (Input) i en la població neuronal específica CCK (IP) en el còrtex parietal (C) i temporal (D) mitjançant qRT-PCR. Les mostres IP han estat normalitzades respecte els seus Input. Dades analitzades amb un t-test no paramètric (\* $p < 0,05$ ). Els resultats es representen de manera individual amb la mitjana  $\pm$  SEM ( $n=4$ /grup) (cCT: Cck:RiboTag:Ndufs4cCT; cKO: Cck:RiboTag:Ndufs4cKO).

## 8.2 Augment en l'expressió de sensors d'estrès i gens activats per inflamació al còrtex de ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO

Una vegada validada la idoneïtat de la tècnica RiboTag per aïllar específicament els transcrits associats a ribosoma (DAR) de la població neuronal CCK, es va procedir a la seqüenciació massiva per RNA-Seq i a la posterior anàlisi bioinformàtica dels resultats per determinar l'expressió diferencial entre mostres. En aquest sentit, l'anàlisi dels components principals (PCA) va determinar que el primer element que definia la variància entre les mostres era el tipus de mostra (*Input* o IP) i el segon element era determinat per l'àrea cerebral de la mostra (còrtex parietal o temporal) (Figura 42A). Per contra, la deleció del gen *Ndufs4* no contribuïa de manera significativa a la variància en la distribució de les mostres en el PCA. La variància aportada pel tipus de mostra (*Input* o IP) va posar de manifest la importància de realitzar un estudi de tipus cel·lular específic per entendre les vies moleculars que coordinen la funció del sistema nerviós central.

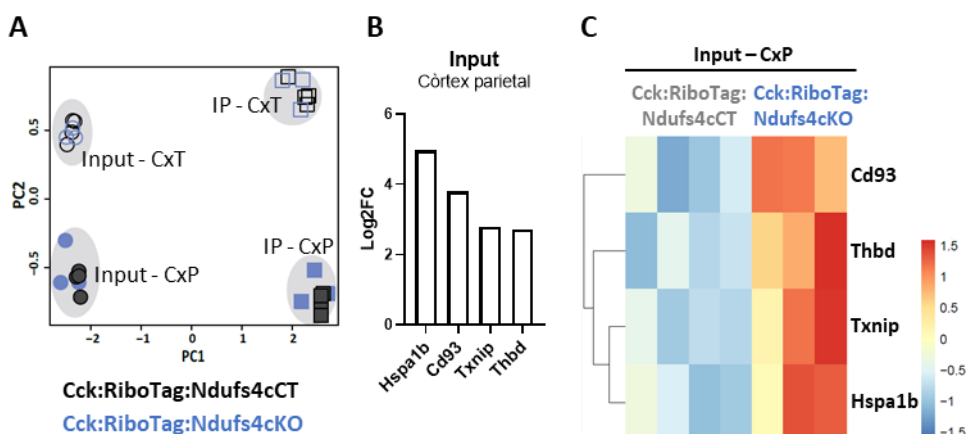
Tot seguit, per tal d'identificar els transcrits diferencialment expressats (DE) a nivell de teixit en el còrtex parietal i temporal degut a la disfunció del gen *Ndufs4* en neurones CCK, es van comparar les mostres *Input* de ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO respecte els controls (*Input*<sub>cKO</sub> vs *Input*<sub>cCT</sub>). Es van establir els transcrits DE amb un nivell de significació *p* ajustat (*padj*) inferior a 0,05 i un canvi relatiu (FC, *fold change*) respecte al control superior a 2 ( $\log_2FC > 1$ ), obtenint així el perfil de transcripció de cada teixit.

En el còrtex parietal dels ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO es van detectar 4 transcrits amb expressió diferencial en comparació als controls, en concret mostraven una expressió augmentada els gens: *Hspa1b*, *Cd93*, *Txnip* i *Thbd* (Figura 42B). *Hspa1b* és un gen que codifica per una xaperona relacionada amb el correcte plegament de les proteïnes, la transcripció del qual es veu augmentada degut a inflamació, estrès oxidatiu o isquèmia. Els gens *Cd93* i *Thbd* (*Cd141*) formen part de la mateixa família de glicoproteïnes transmembrana activadores de l'angiogènesi, actuant com a

## Resultats

neuroprotector i anticoagulant, respectivament. Per últim, el gen *Txnip* actua com a sensor d'estrès activat per inflamació alliberant a la vegada citocines proinflamatòries i bloquejant l'eliminació de ROS. Una descripció més detallada d'aquests gens DE està especificada en la Taula 21. Així mateix, el gràfic de *heatmap* va permetre analitzar el nivell d'agrupació dels diferents transcrits DE (files) segons el patró de resposta augmentada o disminuïda per cada mostra analitzada (columnnes) (Figura 42C). A més, aquest gràfic també mostra la variabilitat biològica en l'expressió de cada transcrit segons la mostra.

Alhora d'analitzar els transcrits DE en el còrtex temporal de les mostres *Input* entre els ratolins *Cck:RiboTag:Ndufs4cKO* i els controls, no es va detectar cap gen amb expressió diferencial. Aquest resultat posa de manifest que la disfunció mitocondrial en les neurones CCK, tot i també estar present en el còrtex temporal, no va causar alteracions en el transcriptoma del teixit als 6 mesos.



**Figura 42.** Anàlisi del transcriptoma tissular (*Input*) en animals *Cck:RiboTag:Ndufs4cKO* en comparació als controls en el còrtex cerebral. **A)** Anàlisi dels components principals que agrupen les mostres analitzades per RNA-Seq segons la seva variància, sent el primer component, el tipus de mostra (*Input* o IP) i el segon component, l'àrea cerebral (còrtex parietal o temporal). **B, C)** Gens diferencialment expressats (DE) en les mostres d'animals *Cck:RiboTag:Ndufs4cKO* en comparació als controls en el còrtex parietal. Canvis relatius d'expressió (B) i *heatmap* (C) dels transcrits DE. En el *heatmap* es pot observar la variació entre els replicats biològics (columnnes) per cada transcrit (files), així com la distribució entre nivells augmentats (vermell) o disminuïts (blau) dels transcrits DE (n=3-4/grup) (CxP: còrtex parietal; CxT: còrtex temporal; FC: canvi relatiu).

Taula 21. Descripció dels gens DE de manera augmentada a nivell tissular (*Input*) en el còrtex parietal de ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO en comparació als ratolins control.

Gen	Nom del gen i funció
Expressió gènica augmentada	<p><b>Hspa1b<sup>1</sup></b></p> <p>Proteïna de xoc tèrmic de la família A membre 1B (<i>Heat shock protein family A member 1B</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Xaperona implicada en el plegament correcte de proteïnes naixents, importació de proteïnes als orgànuls, evitar agregació proteica i promoure degradació de proteïnes mal plegades</li> <li>-Sensor d'estrès que augmenta la seva expressió degut a isquèmia, inflamació, manca de nutrients o exposició a oxidants</li> </ul>
	<p><b>Cd93<sup>2</sup></b></p> <p>Antigen de diferenciació 93 (<i>Cluster of differentiation 93</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Glicoproteïna transmembrana del grup de domini lectina tipus-C (CTLD) família 14</li> <li>-Funció neuroprotectora en model animal d'isquèmia, on es veuen augmentats els seus nivells després de la reperfusió</li> <li>-Promou l'angiogènesi</li> </ul>
	<p><b>Txnip<sup>3</sup></b></p> <p>Proteïna d'interacció amb tioredoxina (<i>Thioredoxin Interacting Protein</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensor de l'estrès que s'activa amb diferents estímuls, canvis metabòlics o temperatura</li> <li>- Causa augment de ROS, inflamació i apoptosi</li> <li>- Bloqueja funció antioxidant de la tioredoxina</li> </ul>
	<p><b>Thbd / Cd141<sup>4</sup></b></p> <p>Trombomodulina (<i>Thrombomodulin</i>) o antigen de diferenciació 141 (<i>Cluster of differentiation 141</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Glicoproteïna transmembrana del grup de domini lectina tipus-C (CTLD) família 14</li> <li>-Exerceix funció anticoagulant unint-se a la trombina i activant la proteïna C (proteasa anticoagulant)</li> <li>-La unió amb diferents lligands modula l'angiogènesi i la resposta inflamatòria</li> </ul>

<sup>1</sup> (Mayer and Bukau 2005; Radons 2016), <sup>2</sup> (Harhausen et al. 2010; Borah, Vasudevan, and Swain 2019; Khan et al. 2019), <sup>3</sup> (Chung et al. 2006; Mohamed et al. 2015), <sup>4</sup> (Borah, Vasudevan, and Swain 2019; Ito, Kakuuchi, and Maruyama 2021; Khan et al. 2019; Sillen and Declerck 2021).

### **8.3 Gens relacionats amb la matriu extracel·lular i el citoesquelet presenten expressió alterada a nivell de neurones CCK en el context de la disfunció mitocondrial**

Per tal de determinar a nivell del tractoma el paper de la disfunció mitocondrial en les neurones CCK, es van comparar mostres immunoprecipitades dels ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO amb mostres del grup control (IP<sub>cKO</sub> vs IP<sub>cCT</sub>) de les dues àrees cerebrals per separat (còrtex parietal i temporal). En aquest sentit, es van establir els transcrits diferencialment associats a ribosoma (DAR) amb un nivell de significació  $p_{adj} < 0,05$  i un canvi relatiu (FC, *fold change*) respecte al control superior a 2 ( $\log_2 FC > 1$ ).

En les neurones CCK del còrtex parietal es van detectar 10 gens diferencialment associats a ribosoma, 7 dels quals presentaven una associació augmentada i 3 disminuïda respecte al control (Figura 43A). D'entre els transcrits amb associació augmentada a ribosoma n'hi havia diversos de vinculats amb la matriu extracel·lular així com amb el citoesquelet, com és el cas del receptor d'integrines amb unió al col·lagen *Itga11*, la pròpia proteïna del col·lagen *Col6a2*, *Ppp1r18* amb unió als filaments d'actina, *Cip4* participant en la reorganització de la membrana plasmàtica o la cadherina *Cdh13* relacionada amb les unions cèl·lula-cèl·lula. Addicionalment, també cal mencionar el receptor *Bdkrb2* que exerceix una funció neuroprotectora posteriorment a un esdeveniment isquèmic i *C1ra* que forma part del sistema del complement desencadenant la resposta immunitària innata. Paral·lelament, en els transcrits amb associació disminuïda a ribosoma en les mostres Cck:RiboTag:Ndufs4cKO es trobava la protoherina *Pcdha8*, relacionada amb el tràfic de glutamat en la membrana postsinàptica, la subunitat NDUFS4 del CI i un RNA no codificant de cadena llarga (9130017K11Rik). Una descripció més detallada de tots els gens DAR està especificada en Taula 22. A més, el gràfic de *heatmap* també va destacar la variabilitat entre mostres biològiques (columnes) per cada transcrit DAR (files) en el còrtex parietal (Figura 43B).

En aquest cas, la comparació de les mostres del còrtex temporal entre animals Cck:RiboTag:Ndufs4cKO i controls tampoc va revelar cap transcrit DAR. De nou, aquest resultat posa de manifest que la deficiència de la subunitat mitocondrial NDUF54 no té efectes a nivell del traductoma de les neurones CCK en una àrea cerebral com és el còrtex temporal, ressaltant la vulnerabilitat específica del còrtex parietal enfront la malaltia mitocondrial.

**Taula 22. Descripció dels gens DAR en la població neuronal CCK del còrtex parietal de ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO en comparació als ratolins control.**

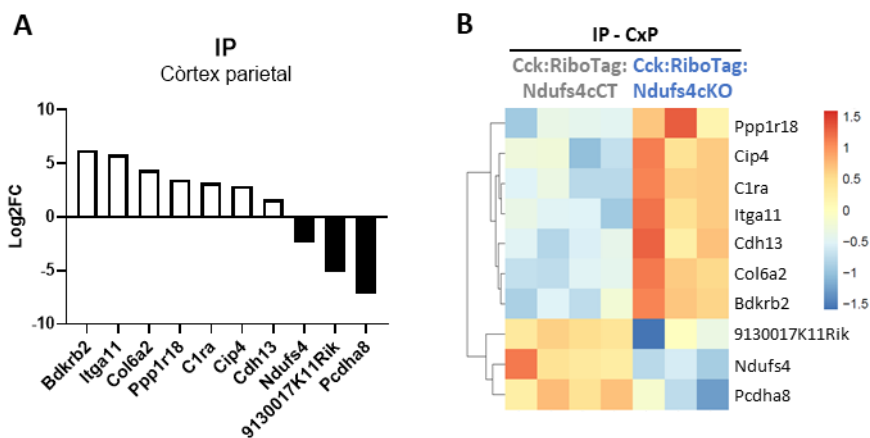
Gen	Nom del gen i funció	
<b>DAR augmentat</b>	<b><i>Bdkrb2</i><sup>1</sup></b>	Receptor de Bradicinina B2 ( <i>Bradykinin Receptor B2</i> ) -Receptor amb expressió ubiqüa activat pel pèptid Bradicinina -Funció neuroprotectora en isquèmia promovent angiogènesi, reduint ROS i inhibint apoptosi.
	<b><i>Itga11</i><sup>2</sup></b>	Integrina $\alpha$ 11 ( <i>Integrin <math>\alpha</math> 11</i> ) -Receptor integrina de membrana que s'uneix a col·lagen -Relacionat amb vies biològiques com inflamació o adhesió cel·lular -Expressió augmentada per Interferó de tipus I (IFN I)
	<b><i>Col6a2</i><sup>3</sup></b>	Col·lagen tipus VI cadena $\alpha$ 2 ( <i>Collagen Type VI Alpha 2 Chain</i> ) -Proteïna de la matriu extracel·lular -Funció neuroprotectora en el sistema nerviós central
	<b><i>Ppp1r18</i><sup>4</sup></b>	Regulador de proteïna fosforilasa 1 subunitat 18 ( <i>Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 18</i> ), Fostensina -S'uneix a PP1 (proteïna fosfatasa 1) formant un complex amb associació als filaments d'actina -Alenteix l'allargament dels filaments d'actina del citoesquelet
	<b><i>C1ra</i><sup>5</sup></b>	Component del complement 1R, subcomponent A ( <i>Complement C1r-A subcomponent</i> ) -Forma part de la via clàssica del sistema del complement, activada per un patogen -Sistema del complement desencadena la resposta immunitària innata
	<b><i>Cip4/Trip10</i><sup>6</sup></b>	Proteïna 4 d'interacció amb Cdc42 ( <i>Cdc42-interacting protein 4</i> ) -Promou invaginacions de la membrana plasmàtica, formació de túbuls i filaments d'actina. Regula endocitosis -Participa en la translocació de GLUT4 a la membrana plasmàtica
	<b><i>Cdh13</i><sup>7</sup></b>	Cadherina 13 o Cadherina T ( <i>T-cadherin</i> ) -Cadherina sense domini transmembrana ni citosòlic distribuïda uniformement en la membrana plasmàtica



## Resultats

		-Expressió en el còrtex cerebral en neurones i astròcits, entre d'altres cèl·lules -Participa en proliferació i migració cel·lular
DAR disminuït	<b><i>Ndufs4</i></b> <sup>8</sup>	NADH deshidrogenasa ( <i>NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S Protein 4</i> ) -Subunitat del complex I mitocondrial, el qual acceptada electrons de NADH per transferir-los a la ubiquinona i bombejar 4 protons a l'espai intermembranós
		<b>9130017K11Rik</b> <sup>9</sup>
	<b><i>Pcdha8</i></b> <sup>10</sup>	Protocadherina $\alpha$ 8 ( <i>Protocadherin Alpha 8</i> ) -Pcdh- $\alpha$ ubicades en axons neuronals. Disminueixen amb mielinització
		-Protocadherines poden estar localitzades en endosomes de reciclatge, relacionats en el tràfic de glutamat cap a la membrana postsinàptica -En funció del tipus cel·lular poden afavorir o evitar la sinapsi

<sup>1</sup> (Marceau and Regoli 2004; Ji et al. 2017); <sup>2</sup> (Tiger et al. 2001; Coelho et al. 2006); <sup>3</sup> (Cheng et al. 2009; Cescon et al. 2015); <sup>4</sup> (Lai et al. 2009; Lin et al. 2011); <sup>5</sup> (Gál et al. 2009; Oncul and Afshar-Kharghan 2020); <sup>6</sup> (Itoh et al. 2005; Hartig et al. 2009; Brunet et al. 2020); <sup>7</sup> (Takeuchi and Ohtsuki 2001; Philippova et al. 2009); <sup>8</sup> (Cogliati et al. 2018); <sup>9</sup> (National Center for Biotechnology Information 2021); <sup>10</sup> (Yagi 2008; Phillips, LaMassa, and Nie 2017).



**Figura 43. Anàlisi del traductoma específic de neurones CCK (IP) en animals Cck:RiboTag:Ndufs4cKO en comparació als controls en el còrtex cerebral. A, B) Gens diferencialment associats a ribosoma (DAR) en les mostres d'animals Cck:RiboTag:Ndufs4cKO en comparació als controls a nivell de neurones CCK en el còrtex parietal. Canvis relatius (A) i heatmap (B) dels transcrits DAR. En el heatmaps es pot observar la variació entre els replicats biològics (columnes) per cada transcrit (files), així com la distribució entre nivells augmentats (vermell) o disminuïts (blau) dels transcrits DAR (n=3-4/grup) (CxP: còrtex parietal; FC: canvi relatiu).**

#### **8.4 Processos biològics comuns entre ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO i controls a nivell de neurones CCK en comparar dues àrees corticals**

Tot i que la deficiència mitocondrial estava present en totes les neurones CCK del còrtex, aquesta va evidenciar una resposta gènica diferencial entre les dues àrees neuroanatòmiques analitzades, el còrtex parietal i temporal. Per una banda, l'àrea cerebral analitzada va esdevenir el segon component de variància entre les mostres (Figura 42A). Per altra banda, no es van detectar transcrits DE ni DAR en comparar mostres de ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO i control en el còrtex temporal, i en canvi sí en el còrtex parietal (Figura 42B i 43A). Aquests resultats suggerien que cada àrea cortical analitzada, i de manera específica les neurones CCK d'aquestes, presentava una expressió gènica característica i pròpia.

En aquest sentit, en analitzar el perfil traduccional de les neurones CCK del còrtex parietal (CCK<sup>CxP</sup>) respecte a les del còrtex temporal (CCK<sup>CxT</sup>), aquestes exhibien diferències en el nombre de transcrits DAR en funció del genotip. Així, al comparar el perfil traduccional d'aquestes, les mostres control presentaven 2532 transcrits DAR, mentre que en les mostres amb disfunció mitocondrial es van detectar 1559 transcrits DAR (Figura 44A). L'anàlisi d'ontologia gènica de processos biològics aplicat als 2532 transcrits DAR, tant enriquits com deplecionats, en neurones CCK<sup>CxP</sup> respecte neurones CCK<sup>CxT</sup> en animals control va revelar que els processos més significatius estaven relacionats amb el transport de ions i funcions vinculades amb la sinapsis, com la seva organització, activitat o regulació de les vesícules sinàptiques (Figura 44B). Aquest mateix estudi realitzat en els 1559 transcrits DAR en les mostres Cck:RiboTag:Ndufs4cKO va mostrar que els processos més significatius estaven també associats al transport de ions, sinapsi i neurotransmissors (Figura 44C), evidenciant que, tot i la diferència en el nombre de transcrits DAR entre les mostres control i Cck:RiboTag:Ndufs4cKO, els processos més significatius eren comuns entre els dos tipus de mostres a nivell de neurones CCK<sup>CxP</sup> en comparació a CCK<sup>CxT</sup>.

## Resultats

Subseqüentment, per inferir els processos biològics exclusivament regulats en neurones CCK<sup>CxP</sup> respecte a neurones CCK<sup>CxT</sup> en funció del genotip, es va realitzar un anàlisi de superposició dels transcrits DAR en les mostres amb disfunció mitocondrial i les control. Aquest anàlisi va detectar 1320 transcrits comuns, 1212 transcrits DAR exclusivament en els controls i 239 transcrits DAR exclusivament en mostres Cck:RiboTag:Ndufs4cKO (Figura 44D). L'anàlisi d'ontologia gènica aplicat als transcrits DAR només en les mostres control (1212), o als transcrits DAR exclusivament en les mostres Cck:RiboTag:Ndufs4cKO (239) en comparar CCK<sup>CxP</sup> respecte CCK<sup>CxT</sup>, va revelar un únic procés significatiu relacionat amb la morfogènesi cel·lular en el cas de les mostres control, així com canvis en la regulació de l'activitat ATPasa en les mostres amb la disfunció mitocondrial. Aquests resultats indiquen novament, que el perfil traduccional de les neurones CCK està més vinculat amb l'àrea neuroanatomica analitzada, còrtex parietal o temporal, deixant en un segon pla els efectes deguts a la disfunció del gen *Ndufs4*.

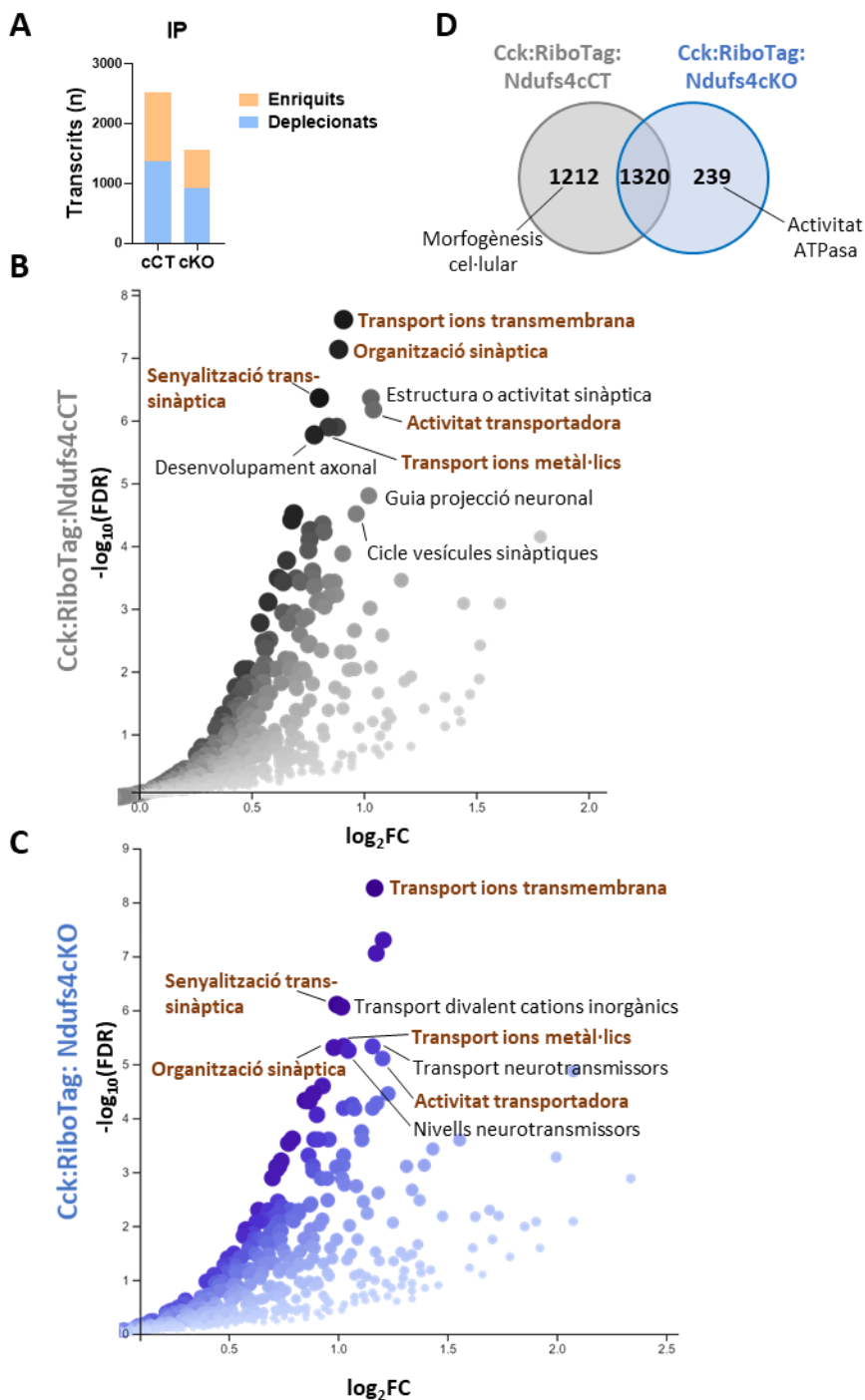


Figura 44. Reducció en el nombre de transcrits DAR en mostres Cck:RiboTag:Ndufs4cKO a nivell de neurones CCK entre el còrtex parietal i el còrtex temporal en comparació als controls. A) Nombre de transcrits DAR en el còrtex parietal a nivell de neurones CCK comparant amb el còrtex temporal en el grup control i el grup amb deficiència *Ndufs4*.

## Resultats

**B, C)** Anàlisi d'ontologia gènica (processos biològics) dels transcrits DAR en les neurones CCK comparant el còrtex parietal i temporal en animals Cck:RiboTag:Ndufs4cCT (B) i Cck:RiboTag:Ndufs4cKO (C). Processos biològics comuns entre mostres control i mostres amb deficiència *Ndufs4* destacats en marró. Els processos no relacionats amb el sistema nerviós han estat exclosos. **D)** Diagrama de Venn dels transcrits DAR en neurones CCK del còrtex parietal respecte el còrtex temporal en el grup control i el grup amb deficiència de *Ndufs4*. El nombre superposat representa els transcrits DAR comuns entre les dues comparacions i els números no superposats especifiquen els transcrits DAR únics per a cada condició. S'indiquen els processos biològics significatius dels transcrits DAR únics. (cCT: Cck:RiboTag:Ndufs4cCT; cKO: Cck:RiboTag:Ndufs4cKO; FDR: *False discovery rate*)

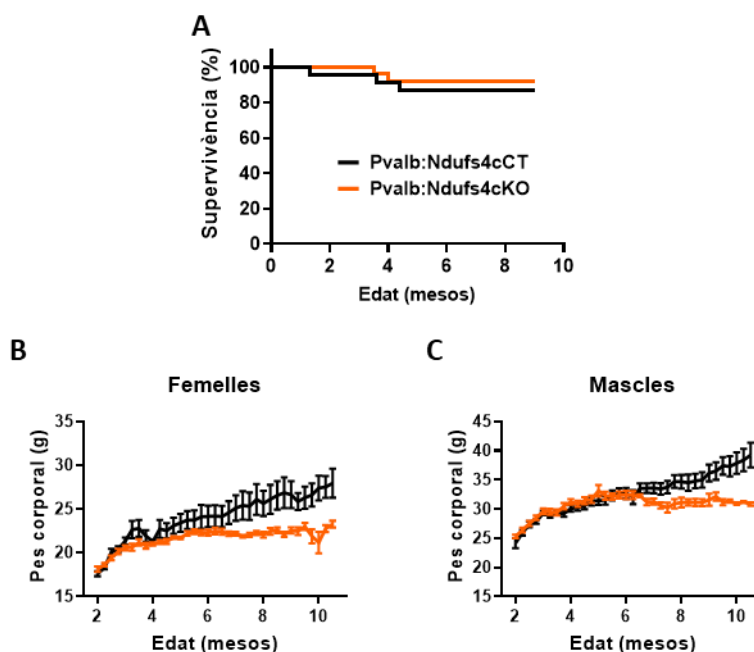
### **9. Caracterització del fenotip conductual en ratolins amb deficiència del gen *Ndufs4* en neurones PVALB**

La deficiència del gen *Ndufs4* en les neurones CCK va desenvolupar un patró neuroinflamatori progressiu centrat en el còrtex cerebral associat a un fenotip motor i social. Per tal d'elucidar si altres poblacions neuronals corticals mostraven el mateix grau de susceptibilitat a la deficiència del CI, es va generar un ratolí amb deleció condicional de *Ndufs4* en neurones que expressen la proteïna d'unió al calci parvalbúmina (PVALB) (ratolí Pvalb:Ndufs4cKO) i els respectius controls (ratolí Pvalb:Ndufs4cCT). Les neurones PVALB positives són una de les poblacions GABAèrgiques més abundants en el còrtex i l'hipocamp, presentant un patró d'activitat neuronal ràpid (Hu, Gan, and Jonas 2014; Whissell et al. 2015), que podria potencialment fer-les més vulnerables a la disfunció mitocondrial (Inan et al. 2016).

#### **9.1 Caracterització dels trets fenotípics generals dels animals Pvalb:Ndufs4cKO**

En primer lloc, la deficiència del gen *Ndufs4* en les neurones PVALB no va afectar a la supervivència dels animals Pvalb:Ndufs4cKO monitoritzats fins als 9 mesos d'edat (Figura 45A). Així mateix, no es van detectar diferències en el pes corporal registrat fins als 10 mesos d'edat en ratolins Pvalb:Ndufs4cKO respecte els controls femelles ni mascles (Figura 45B, C). Si bé els animals Pvalb:Ndufs4cKO inicialment seguien un

patró de desenvolupament indistingible dels controls, al voltant dels 6 mesos d'edat presentaven problemes motors i d'afectació de la marxa evidents.



**Figura 45.** La deficiència del gen *Ndufs4* en neurones PVALB no afecta a la supervivència ni al pes dels ratolins Pvalb:Ndufs4cKO. **A**) Corba de supervivència dels animals Pvalb:Ndufs4cKO (n=26) i control (n=23). Dades analitzades estadísticament amb el test Log-rank. **B, C**) Pes corporal de ratolins femelles (B) i mascles (C) (femelles n=2-15; mascles control n=2-10). Els resultats es representen com la mitjana  $\pm$  SEM. Dades analitzades estadísticament amb una ANOVA de 2 factors amb mesures repetides.

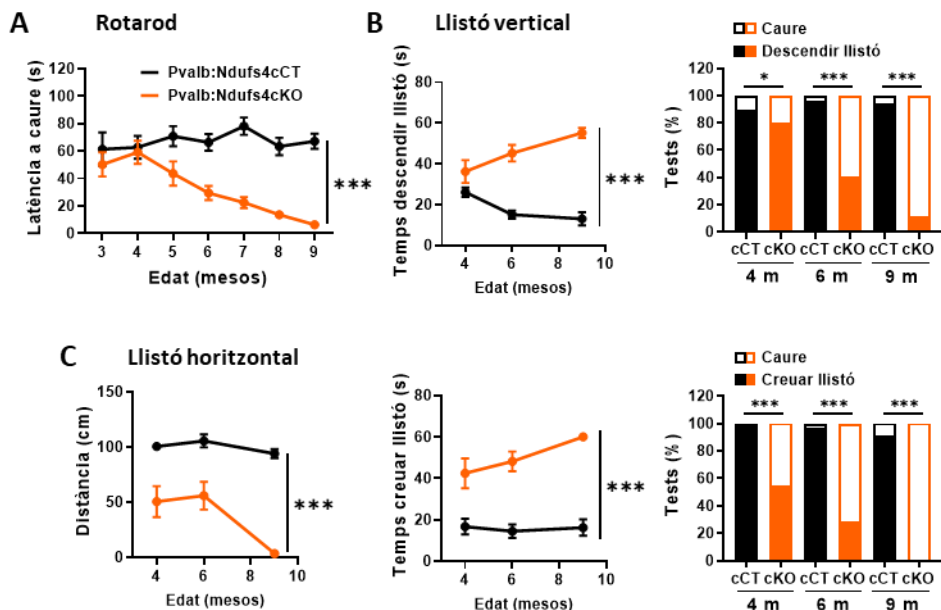
## 9.2 Els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO presenten alteracions severes de la coordinació motora i l'equilibri

Per tal de caracteritzar els problemes motors, es va avaluar la coordinació motora dels animals Pvalb:Ndufs4cKO i els seus controls amb el test *rotarod*, tot comparant el temps de latència en caure de la barra giratòria. Els nostres resultats mostren que els animals Pvalb:Ndufs4cKO podien mantenir-se sobre la barra en rotació significativament menys temps que els respectius controls (Figura 46A). Aquests dèficits de coordinació motora dels ratolins amb disfunció mitocondrial es van fer evidents a partir dels 5 mesos d'edat, i van empitjorar de manera progressiva amb

## Resultats

el temps fins a registrar menys de 10 segons de temps de latència per caure als 9 mesos.

En línia amb aquests resultats, els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO presentaven latències significativament majors per descendir d'un llistó vertical a partir dels 6 mesos d'edat (Figura 46B). A més a més, el percentatge de vegades que els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO queien de la barra als 4 mesos era del 20%, augmentant al 88% de caigudes als 9 mesos, mentre que els animals controls realitzaven correctament la tasca de descendir amb una mitjana del 6% de caigudes en els diferents temps (Figura 46B). Un altre test per analitzar la coordinació motora en rosegadors consisteix en fer-los creuar per un llistó horitzontal. En aquest cas, els animals Pvalb:Ndufs4cKO encara presentaven un fenotip motor més sever ja que des dels 4 mesos recorrien menys distància del llistó i trigaven més temps en fer la tasca en comparació als controls (Figura 46C). També cal destacar que el nombre de vegades en creuar completament la barra es va veure molt disminuït en els animals Pvalb:Ndufs4cKO a mesura que envellien, arribant al punt que als 9 mesos d'edat, cap ratolí amb disfunció mitocondrial va ser capaç de realitzar la tasca sense caure (Figura 46C).

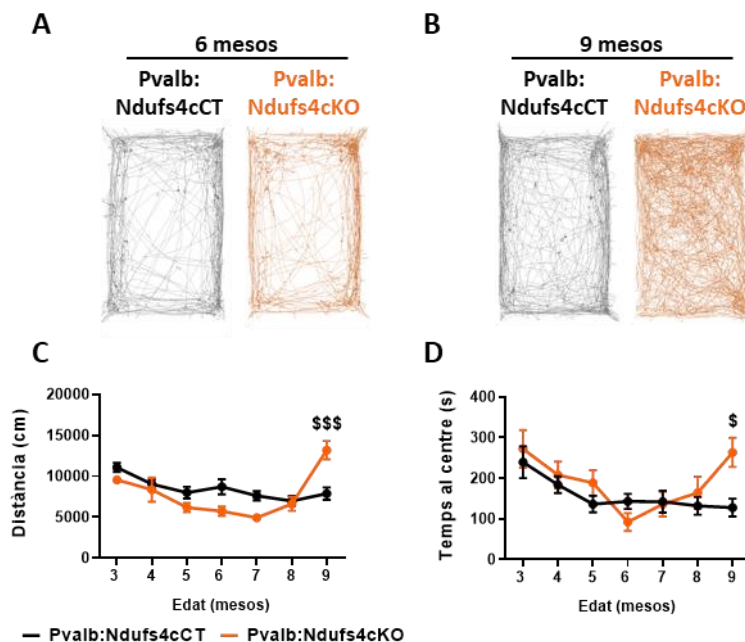


**Figura 46.** Els ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO* presenten alteracions severes de la coordinació motora i l'equilibri. **A)** Temps de latència per caure al test del *rotarod* dels ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO* (n=14) i controls (n=14). **B)** Temps en assolir la base baixant per un llistó vertical i percentatge d'encerts i caigudes de ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO* (n=9-14) i controls (n=10-17). **C)** Distància recorreguda en travessar un llistó horitzontal, temps en fer la tasca i percentatge d'encerts i caigudes de ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO* (n=9-14) i controls (n=10-17). Els resultats es representen com la mitjana  $\pm$  SEM. Panells percentatge encerts i caigudes, dades analitzades estadísticament amb  $\chi^2$  amb 1 grau de llibertat (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001). En la resta de panells, dades analitzades estadísticament amb un test ANOVA de 2 factors amb mesures repetides (\*\*p<0,001) (cCT: *Pvalb:Ndufs4cCT*; cKO: *Pvalb:Ndufs4cKO*; m: mesos).

### 9.3 La deficiència del gen *Ndufs4* en neurones *PVALB* causa hiperactivitat tardana

Curiosament, les afectacions motores i d'equilibri presentades pels animals *Pvalb:Ndufs4cKO* no es van veure reflectides en l'activitat locomotora en un camp obert en edats primerenques (Figura 47A, C). La distància recorreguda durant 30 minuts amb llibertat de moviments va ser la mateixa entre els ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO* i controls fins als 8 mesos d'edat, moment a partir del qual els animals *Pvalb:Ndufs4cKO* van incrementar la seva locomoció de manera significativa (Figura 47B, C), així com el temps destinat en el centre de la caixa (Figura 47D).



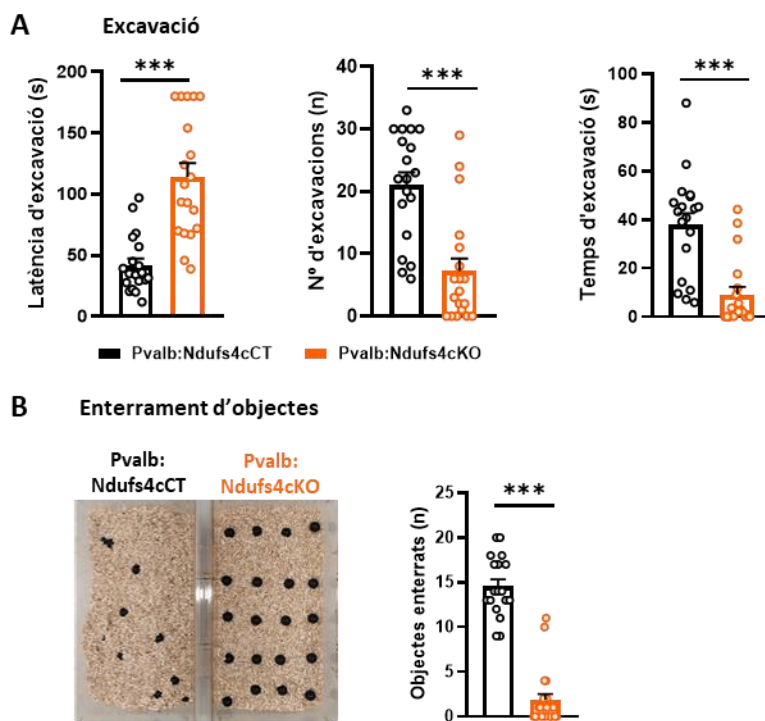


**Figura 47. La deficiència del gen *Ndufs4* en neurones PVALB causa hiperactivitat tardana en animals Pvalb:Ndufs4cKO. A, B)** Recorregut representatiu acumulat durant 30 minuts d'activitat voluntària d'un ratolí Pvalb:Ndufs4cCT (panell esquerre) i un ratolí Pvalb:Ndufs4cKO (panell dret) de 6 mesos (A) i 9 mesos (B) d'edat. **C, D)** Distància recorreguda total d'activitat voluntària durant 30 minuts en camp obert (C) i temps en el centre de la caixa (D) al llarg dels mesos en ratolins Pvalb:Ndufs4cKO (n=14) i controls (n=11-14). Els resultats es representen com la mitjana  $\pm$  SEM. Dades analitzades estadísticament amb un ANOVA de 2 factors amb mesures repetides (C:  $p < 0,0001$  interacció genotip x temps; \$\$\$  $p < 0,001$  respecte genotip; D:  $p < 0,05$  interacció genotip x temps; \$  $p < 0,05$  respecte genotip).

#### 9.4 Comportament anòmal d'excavació i enterrament d'objectes en ratolins Pvalb:Ndufs4cKO

A la natura, els rosegadors tenen tendència a excavar per trobar o amagar menjar, per refugiar-se del fred o passar desapercebuts per a un depredador (Deacon 2006). Tot i així, els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO mostraven un comportament d'excavació característic respecte als controls a simple vista, motiu pel qual es va quantificar aquesta conducta ubicant-los en una caixa amb serradures noves amb un gruix de 5 cm. Als 7 mesos d'edat, els animals Pvalb:Ndufs4cKO trigaven més temps en començar a excavar, amb una menor freqüència i durada de les excavacions en

comparació als controls (Figura 48A). Per tal de confirmar aquesta observació, es va emprar el test de *marble burying*, on el ratolí ha d'enterrar un nombre definit de bales, tot observant-se una disminució significativa dels objectes enterrats pels animals Pvalb:Ndufs4cKO (Figura 48B). De fet, molts dels animals Pvalb:Ndufs4cKO no van enterrar cap de les 20 bales passats 20 minuts i sense desplaçar-les de la seva ubicació inicial (Figura 48B).



**Figura 48. Comportament anòmal d'excavació i enterrament d'objectes en ratolins Pvalb:Ndufs4cKO de 7 mesos d'edat. A)** Latència, nombre de vegades i temps total d'excavació en una caixa amb serradures noves dels ratolins Pvalb:Ndufs4cKO (n=19) i controls (n=19). **B)** Imatge representativa de les bales enterrades després de 20 minuts i quantificació dels objectes total o parcialment enterrats per ratolins Pvalb:Ndufs4cKO (n=22) i controls (n=18). Els resultats es representen de manera individual amb la mitjana  $\pm$  SEM. Dades analitzades estadísticament amb un test t-Student no aparellat i no paramètric (\*\*\*) $p < 0,001$ .

## 9.5 Caracterització del fenotip social en ratolins Pvalb:Ndufs4cKO

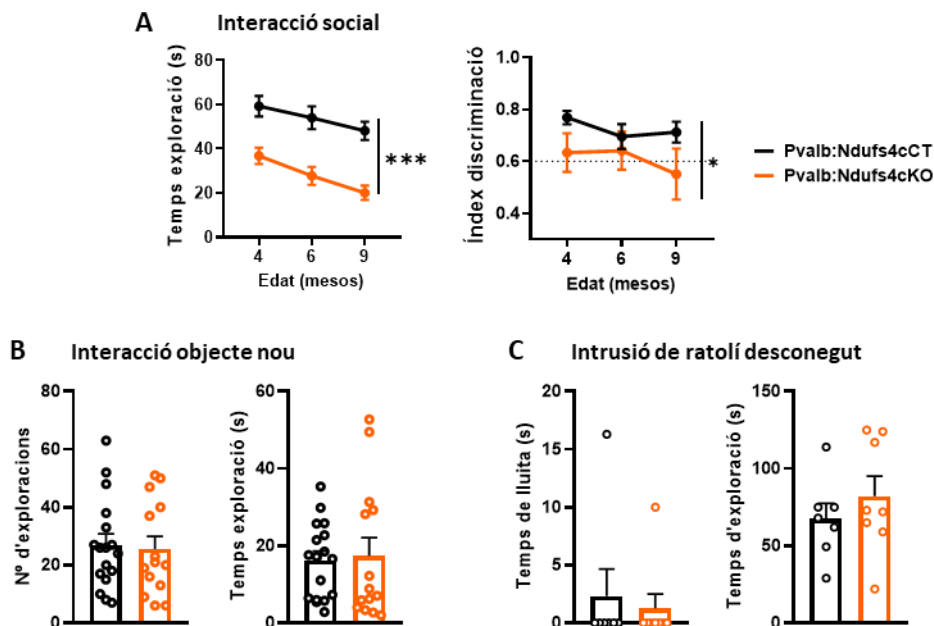
Per tal d'avaluar la conducta d'interaccions socials derivada de la disfunció mitocondrial en neurones PVALB, es va dur a terme el test de les 3 cambres. Els

## Resultats

animals Pvalb:Ndufs4cKO van explorar menys temps conjuntament el cilindre buit i el ratolí desconegut en comparació als controls en les 3 edats analitzades (Figura 49A). Addicionalment, es va detectar una disminució en la socialització dels animals Pvalb:Ndufs4cKO als 9 mesos d'edat, manifestada amb un  $DI < 0,6$  (Figura 49A).

Per descartar que aquesta menor interacció social per part dels animals Pvalb:Ndufs4cKO estigués motivada per una disminució en la curiositat d'aquests animals i no pas al component social d'interaccionar amb un altre individu, es va analitzar la conducta d'interacció amb un objecte nou. En aquest cas, als 6 mesos d'edat els animals Pvalb:Ndufs4cKO van visitar l'objecte nou el mateix nombre de vegades i durant el mateix temps d'interacció que els animals control (Figura 49B). Aquests resultats van demostrar que els animals Pvalb:Ndufs4cKO tenien els mateixos nivells de curiositat per un objecte inanimat que els controls, i per tant, les alteracions observades en el test de les 3 cambres només estaven motivades per un component social.

Per tal de continuar amb la caracterització de la sociabilitat i l'agressivitat, es va dur a terme el test d'intrusió de ratolí desconegut, pel qual es col·loca un ratolí desconegut en la gàbia del ratolí d'estudi (resident) i se n'analitza l'agressivitat i les interaccions. Els dos ratolins mascles tenien llibertat total per interaccionar sense restriccions (Koolhaas et al. 2013). Els animals Pvalb:Ndufs4cKO no van mostrar un comportament d'agressivitat en comparació als controls amb un temps d'exploració sense diferències (Figura 49C).



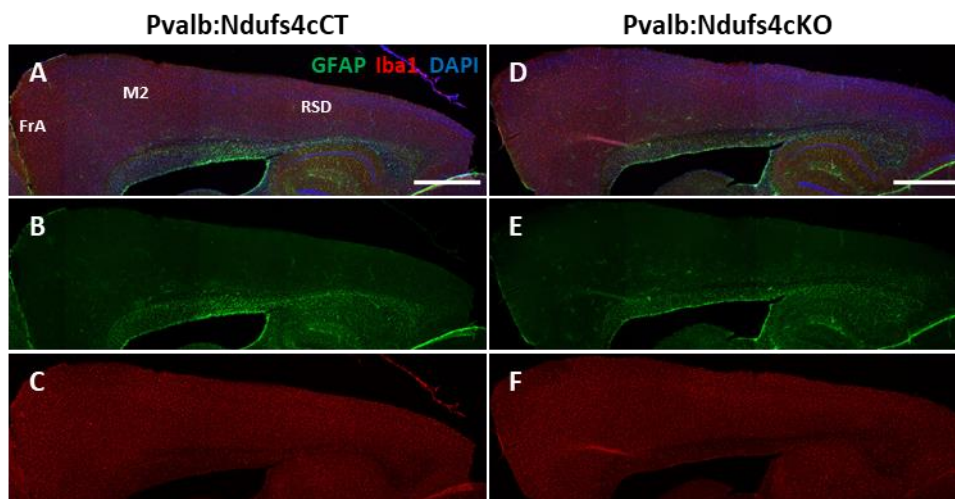
**Figura 49. Caracterització del fenotip social en ratolins Pvalb:Ndufs4cKO.** **A)** Estudi de la interacció social en 3 compartiments amb la presència d'un ratolí nou per explorar amb accés limitat. Temps total d'exploració (animal desconegut + gàbia buida) i índex de discriminació social (DI) dels animals Pvalb:Ndufs4cKO (n=13-17) i controls (n=13-16). Valors de DI superiors a 0,6 indiquen sociabilitat. Els resultats es representen com la mitjana  $\pm$  SEM. Dades analitzades estadísticament amb un ANOVA de 2 factors amb mesures repetides (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). **B)** Nombre de vegades en olorar activament un objecte nou i temps total de cada exploració dels animals Pvalb:Ndufs4cKO (n=14) i controls (n=17) als 6 mesos d'edat. **C)** Temps lluitant amb un ratolí nou en la mateixa gàbia i temps d'exploració dels animals Pvalb:Ndufs4cKO (n=8) i controls (n=7) mascles. Si no s'indica el contrari, els resultats es representen de manera individual amb la mitjana  $\pm$  SEM i dades analitzades estadísticament amb una t Student no aparellat i no paramètric.

## 10. Neuroinflamació en el cerebel degut a la deficiència del gen *Ndufs4* en neurones PVALB

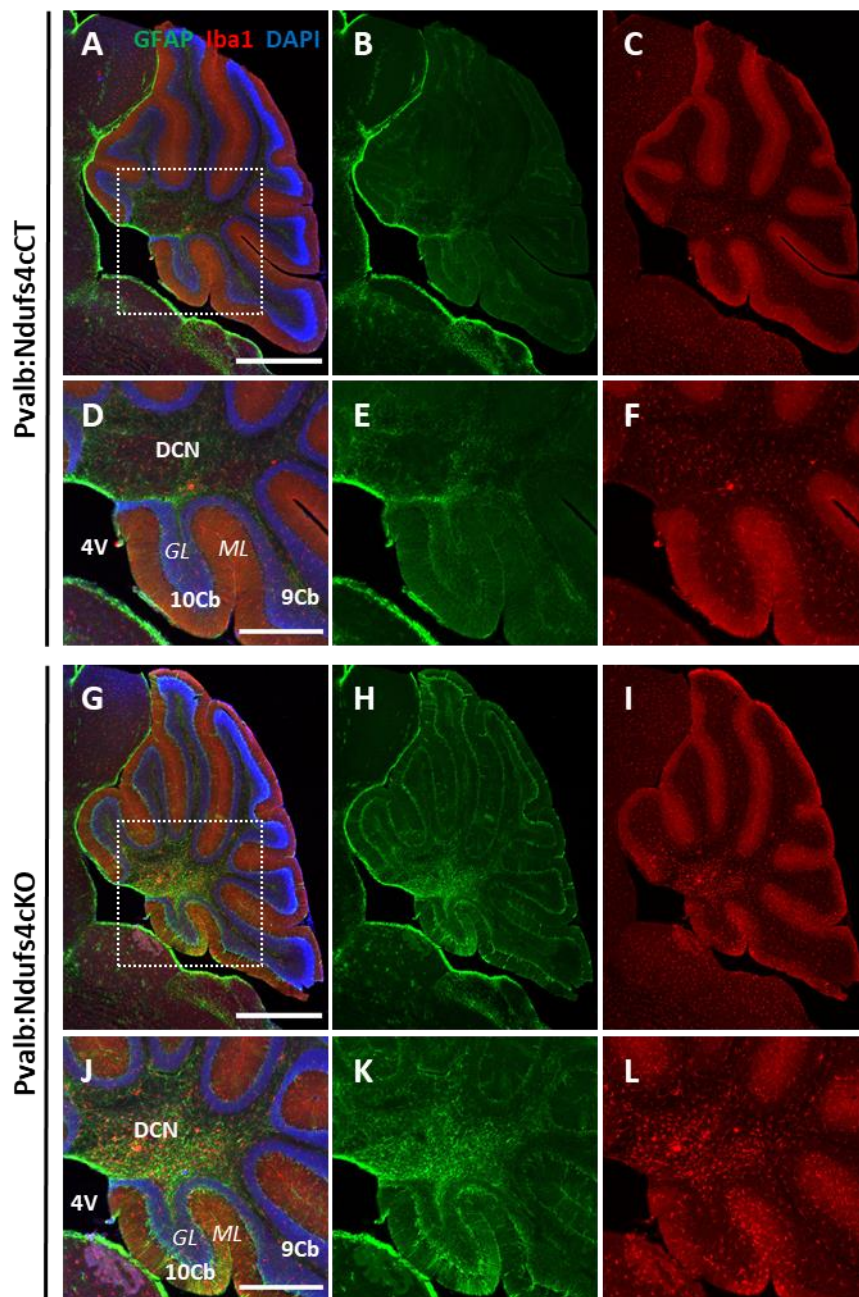
Una vegada descrit el fenotip motor i social presentat pels ratolins Pvalb:Ndufs4cKO, era de vital importància analitzar les possibles afectacions neuroinflamatòries degudes a la disfunció del gen *Ndufs4*. Curiosament en aquest sentit, el còrtex cerebral dels animals Pvalb:Ndufs4cKO no va presentar alteracions en el marcatge d'astròcits amb GFAP (Figura 50E) ni de la micròglia amb Iba1 (Figura 50F) en comparació als controls als 9 mesos d'edat.

## Resultats

Pel contrari, el cerebel va ser l'àrea cerebral amb més afectació detectada en els ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO*. Concretament, mostraven un augment en el marcatge dels astròcits per GFAP (Figura 51H, K) així com canvis en la morfologia de la micròglia (Figura 51I, L) ubicats en el lòbul profund del cerebel, com són el novè i desè lòbul cerebelar (9Cb i 10Cb), específicament en la capa molecular, a més dels nuclis del cerebel. En conjunt, la disfunció del gen *Ndufs4* en neurones PVALB no va provocar alteracions en el còrtex cerebral, relacionant per tant, la deficiència en la coordinació motora i equilibri dels animals *Pvalb:Ndufs4cKO* amb les afectacions observades al cerebel.



**Figura 50.** La disfunció del gen *Ndufs4* en neurones PVALB no provoca afectacions corticals en els ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO*. A-F) Marcatge dels astròcits amb anticossos contra GFAP (verd), micròglia amb anticossos contra Iba1 (vermell) i dels nuclis cel·lulars amb tinció DAPI (blau) en animals control (A-C) i animals *Pvalb:Ndufs4cKO* (D-F) de 9 mesos d'edat en tall sagital corresponent a la coordenada Lateral 0,48 mm. (FrA: còrtex prefrontal; M2: còrtex motor secundari; RSD: còrtex retrospleni disgranular) (n=1 cCT i n=3 cKO) Escala = 1 mm.



**Figura 51. Neuroinflamació en els nuclis profunds del cerebel en ratolins Pvalb:Ndufs4cKO A-L)** Marcatge dels astròcits amb anticossos anti-GFAP (verd), micròglia amb anticossos anti-Iba1 (vermell) i nuclis cel·lulars amb el colorant DAPI (blau) en ratolí control (A-F) i ratolí Pvalb:Ndufs4cKO (G-L) de 9 mesos d'edat en tall sagital corresponent a la coordenada Lateral 0,48 mm. Requadre puntejat en panell A ampliat en panell D i requadre puntejat en panell G ampliat en panell J. (4V: quart ventricle; 9Cb: novè lòbul del cerebel; 10Cb: desè lòbul del cerebel; DCN: nuclis del cerebel; GL: capa granular; ML: capa molecular) Escala (A, G) = 1 mm; escala (D, J) = 500  $\mu$ m.



# Discussió

---





## 1. El còrtex cerebral com a àrea secundària en la SL

La SL és una malaltia mitocondrial primària caracteritzada per presentar una encefalopatia necrotitzant subaguda, la qual es manifesta de manera progressiva i severa predominantment en infants. Entre els signes clínics destaquen les alteracions motores, l'epilèpsia, les dificultats respiratòries, així com una regressió en el desenvolupament motor i intel·lectual (Baertling et al. 2014; Finsterer 2008). L'alta diversitat de signes clínics presents en els pacients amb SL va en consonància amb el gran nombre de mutacions patològiques identificades. En aquest sentit, mutacions en gens que codifiquen per subunitats integrants de la ETC o bé per proteïnes que participen en l'assemblatge i l'estabilitat dels complexos han estat descrites com a causants de la SL (Lake et al. 2015). Malauradament, en l'actualitat no existeix un tractament efectiu pels pacients amb SL (Baertling et al. 2014), els quals presenten una supervivència mitjana de 2 anys (S. Rahman et al. 1996).

L'alta demanda energètica en les funcions del SNC, i en concret de les neurones, tals com el manteniment del potencial d'acció, el gradient electroquímico i l'alliberació de vesícules sinàptiques, fan que sigui un dels òrgans més afectats en les malalties mitocondrials (Attwell and Laughlin 2001; Devine and Kittler 2018). Malgrat la diversitat de gens causants de patologia i l'heterogeneïtat dels signes clínics descrits, la SL es caracteritza per un patró neuropatològic molt concret amb lesions bilaterals, simètriques i necrotitzants principalment en els ganglis basals i/o tronc de l'encèfal (Lake et al. 2015; Sofou et al. 2014). No obstant, en alguns casos altres àrees cerebrals tals com còrtex, cerebel, tàlem o medul·la espinal també mostren alteracions (Cavanagh and Harding 1994; Sofou et al. 2018). Generalment, es té en compte l'aportació a la patologia dels ganglis basals i el tronc de l'encèfal per la seva prevalença, deixant en segon pla la resta de zones cerebrals implicades.

En particular, en un estudi realitzat en 96 pacients diagnosticats amb SL, el 18% mostrava alteracions corticals incloent atrofia cortical general o dels lòbuls frontals i temporals, senyals hiperintenses en imatges de T2, lesions tipus-isquèmia en el lòbul

frontal de manera unilateral o increments de lactat detectats per espectroscòpia. A més a més, es va observar una implicació cortical de manera significativa en aquells pacients portadors de mutacions en subunitats NDUF del CI (7/12), mentre que amb menys freqüència en individus diagnosticats amb dèficits en el CIV, mutacions en el mtDNA o en l'enzim piruvat deshidrogenasa (Sofou et al. 2018). Paral·lelament, en l'anàlisi d'una cohort amb 198 pacients diagnosticats amb deficiències del CI, es reportava atròfia cortical en <25% dels casos i amb una prevalença del 14% si només es tenien en compte els pacients amb mutacions en la subunitat NDUF54 (3/22) (Ortigoza-Escobar et al. 2016). Tal variabilitat en la prevalença de les alteracions corticals en la SL pot ser deguda al nombre de pacients analitzats en cada estudi alhora que en molts d'ells no s'especifica l'estat del còrtex (Ortigoza-Escobar et al. 2016). Per tant, l'escorça cerebral es pot veure implicada i/o alterada com a conseqüència dels dèficits mitocondrials en el context de la SL.

Un altre factor a tenir en compte en el desenvolupament de la patologia mitocondrial és el grau de disfunció mitocondrial present al còrtex cerebral. En mostres corticals de cervells de ratolins *Ndufs4KO* amb patologia avançada es va determinar una reducció del 62% de l'activitat del CI en comparació a les mostres control, mentre que d'altres àrees cerebrals presentaven una reducció en l'activitat del CI major, concretament en el BO (reducció 86%), tronc de l'encèfal (reducció 75%) i cerebel (reducció 72%) (Terburgh et al. 2021). Per tant, tot i que el còrtex cerebral no sigui l'àrea neuroanatòmica amb més requeriments energètics i més vulnerable a curt termini, també presenta una reducció significativa de l'activitat del CI (62%), la qual pot desencadenar patologia a edats més tardanes.

En aquest sentit, els nostres resultats demostren l'inici d'una incipient neuroinflamació en el còrtex dels ratolins *Ndufs4KO* a P50 amb proliferació de la micròglia i reactivitat astroglià. En conjunt, aquestes dades suggereixen que la mort prematura dels ratolins *Ndufs4KO* relacionada amb una neuroinflamació severa i pèrdua neuronal en certes àrees cerebrals tals com BO, tronc de l'encèfal i cerebel,

impedeix que d'altres zones també alterades però amb menor mesura, com el còrtex, esdevinguin greument afectades.

Per tant, considerem que en l'estudi de la SL manquen anàlisis per determinar la contribució del còrtex cerebral en el desenvolupament de la patologia, el qual pot determinar part del fenotip descrit, aportant nous coneixements pel tractament de la malaltia. Per tal d'adreçar aquesta mancança, hem generat dues línies d'animals portadores de disfunció mitocondrial en poblacions neuronals altament abundants en el còrtex cerebral, neurones CCK i PVALB (Freund and Katona 2007; S. Y. Lee and Soltesz 2011).

## **2. Les neurones CCK mostren major vulnerabilitat a la deficiència del gen *Ndufs4* en comparació a les neurones PVALB a nivell cortical**

L'objectiu de la present tesi doctoral és determinar la implicació de la disfunció mitocondrial en dues poblacions neuronals predominants en el còrtex cerebral en el desenvolupament de la patologia en un model animal de la SL. Per tal d'assolir aquest propòsit, es va delecionar de manera selectiva el gen *Ndufs4* en neurones CCK i neurones PVALB (Freund and Katona 2007; S. Y. Lee and Soltesz 2011; Tamamaki et al. 2003). D'acord amb els resultats obtinguts, aquestes dues poblacions neuronals divergeixen en la vulnerabilitat presentada enfront a la deficiència mitocondrial.

Les neurones CCK i PVALB es defineixen per l'expressió d'aquestes proteïnes marcadores. En el cas del neuropèptid CCK, aquest s'expressa en una diversitat major de neurones ja que està present tant en interneurones inhibidores GABAèrgiques (CCK<sup>INT</sup>) (45%) com en excitatòries glutamatèrgiques (55%) (Calvigioni et al. 2017; Morino et al. 1994; Gallopin et al. 2006). Per contra, en el còrtex cerebral la proteïna d'unió al calci PVALB es sintetitza exclusivament en interneurones GABAèrgiques (PVALB<sup>INT</sup>) (Whissell et al. 2015; Tamamaki et al. 2003). La proporció

de PVALB<sup>INT</sup> i CCK<sup>INT</sup> en el còrtex varia en funció de l'àrea neuroanatòmica analitzada, sent més abundants les PVALB<sup>INT</sup> en M1, S1 i S2 mentre que les CCK<sup>INT</sup> predominen en el còrtex prefrontal medial (regió peduncular dorsal i còrtex infralímbic). En conjunt, les PVALB<sup>INT</sup> representen aproximadament el 40% de les interneurons corticals, per contra les CCK<sup>INT</sup> en conformen al voltant del 20% (Whissell et al. 2015).

Adicionalment, tant les PVALB<sup>INT</sup> com les CCK<sup>INT</sup> es defineixen com a interneurons perisomàtiques, ja que estableixen les sinapsis inhibidores en l'àrea adjacent al cos cel·lular de les neurones piramidals que innerven. Tot i que aquests dos subtipus d'interneurons estableixen sinapsis en el mateix domini subcel·lular de la cèl·lula diana, es distingeixen pels seus patrons de resposta, el perfil d'expressió gènica i el seu origen durant el desenvolupament, a més de no mostrar coexpressió dels marcadors CCK i PVALB (Taula 23) (Freund and Katona 2007; Bartos and Elgueta 2012). En aquest sentit, davant d'un estímul excitatori, les CCK<sup>INT</sup> responen de manera lenta i acomodant, generant una inhibició de freqüència moderada o baixa. Contràriament, les PVALB<sup>INT</sup> es caracteritzen per un perfil de resposta inhibidora ràpida (oscil·lacions gamma) i precisa sense acomodació en les cèl·lules postsinàptiques (Bartos and Elgueta 2012; Doischer et al. 2008; Tukker et al. 2007). Aquesta divergència en la resposta sinàptica també comporta uns requeriments energètics específics, sent aquests més alts en les PVALB<sup>INT</sup> (Kann, Papageorgiou, and Draguhn 2014; Ruden, Dugan, and Konradi 2021). L'elevada demanda d'ATP s'assoleix a través del gran nombre de mitocondris que presenten les PVALB<sup>INT</sup> en comparació a d'altres subpoblacions d'interneurons corticals (Gulyás et al. 2006; Inan et al. 2016; Paul et al. 2017; Kontou et al. 2021). Conseqüentment, aquests dos tipus d'interneurons perisomàtiques actuen amb una velocitat de resposta i precisió diferents, contribuint de manera desigual en el processament de la informació neuronal i possiblement efectuant funcions úniques.

**Taula 23. Característiques principals de les interneurons inhibidores CCK (CCK<sup>INT</sup>) i PVALB (PVALB<sup>INT</sup>) en el còrtex (CB1R: receptor cannabinoides tipus 1; 5-HT3: receptor de serotonina) (Bartos and Elgueta 2012; Freund and Katona 2007; Armstrong and Soltesz 2012; Klausberger 2005).**

	CCK <sup>INT</sup>	PVALB <sup>INT</sup>
<b>Patró de resposta</b>	Acomodant, lenta i asincrònica	No-acomodant, ràpida i sincronitzada
<b>Rang d'oscil·lacions</b>	Freqüència moderada, theta (4-12 Hz)	Freqüència alta, gamma (30-100 Hz)
<b>Receptors</b>	CB1R, 5-HT3	-

Per tant, a nivell d'interneurons, caldria esperar una major afectació en el còrtex dels ratolins Pvalb:Ndufs4cKO en comparació als Cck:Ndufs4cKO, suggerit pel patró de resposta ràpida, la freqüència d'oscil·lacions gamma i l'abundància de les PVALB<sup>INT</sup>. No obstant, la disfunció mitocondrial en les neurones CCK pot alterar el balanç neuronal tant en el sistema excitatori com inhibitori degut a l'expressió d'aquest neuropèptid en interneurons GABAèrgiques i neurones piramidals glutamatèrgiques. Aquest fet podria ser la causa de la severitat de les lesions presentades en el còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO, tant a nivell estructural com histològic.

Tot i això, la manca de neuroinflamació aparent en el còrtex dels ratolins Pvalb:Ndufs4cKO no permet descartar alteracions en l'excitabilitat del circuit, la funció inhibitoria i la sincronia cortical causades per la disfunció mitocondrial en les PVALB<sup>INT</sup>, tal i com s'ha observat en un model animal d'esquizofrenia, en el qual canvis en les oscil·lacions gamma de les PVALB<sup>INT</sup> provoquen dèficits cognitius relacionats amb memòria i aprenentatge (Carlén et al. 2012). En la mateixa línia, en un estudi recent s'ha demostrat que en les PVALB<sup>INT</sup>, el bloqueig del transport dels mitocondris als axons neuronals causant la seva acumulació en el soma cel·lular en un model de ratolí provoca canvis en l'arborització dels axons i un augment en les oscil·lacions gamma (30-100 Hz), mentre que la capacitat inhibitoria de resposta ràpida de les PVALB<sup>INT</sup> roman inalterada en l'hipocamp (Kontou et al. 2021). Per

aquest motiu, seria necessari un estudi electrofisiològic exhaustiu centrat en les PVALB<sup>INT</sup> corticals dels ratolins Pvalb:Ndufs4cKO per descartar completament alteracions en aquesta zona cerebral.

### **3. La deficiència del gen *Ndufs4* en neurones CCK desencadena l'aparició d'una cicatriu glial en el còrtex**

Histològicament, en el còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO es detecta la presència de reactivitat astrogliàl als 6 mesos d'edat, la qual evoluciona en els següents mesos fins a esdevenir una cicatriu glial amb ramificacions dels astròcits (Adams and Gallo 2018). El possible escenari d'estrès oxidatiu neuronal, derivat de la disfunció mitocondrial en les neurones CCK i la reducció en el nivells d'ATP, podria ser el major contribuïdor de l'activació de la reacció glial i mort neuronal en el còrtex dels animals Cck:Ndufs4cKO d'edat avançada.

En primer lloc, l'activitat de la ETC duta a terme pel mitocondri és una de les principals fonts de ROS en la cèl·lula (Rigoulet, Yoboue, and Devin 2011; Raha and Robinson 2001). Mutacions en subunitats de la ETC provoquen un desequilibri entre la capacitat antioxidant cel·lular per eliminar ROS i la seva producció, desencadenant en estrès oxidatiu, el qual danya les biomolècules i posteriorment la cèl·lula. El cervell és un òrgan especialment sensible al dany oxidatiu ja que té un alt consum d'oxigen, abundància de substrats fàcilment oxidables i menys capacitat per eliminar ROS en comparació a d'altres òrgans (Gerlach et al. 1994; Drechsel and Patel 2010). Es detecten nivells augmentats de ROS en fibroblasts de pacients amb deficiència del CI per mutacions en diferents subunitats així com en fibroblasts procedents dels ratolins Ndufs4KO (Valsecchi et al. 2013; Verkaart et al. 2007). Consegüentment, la possible alteració mitocondrial en les neurones CCK degut a la deficiència del gen *Ndufs4* pot contribuir a la producció de ROS i a l'estrès oxidatiu en aquest tipus neuronal.

En segon lloc, la possible disminució en la generació d'ATP juntament amb nivells alts d'estrès oxidatiu, condueixen a les neurones portadores d'una mutació mitocondrial a un estat metabòlic vulnerable i eventualment desencadenant la mort neuronal. Per tal de validar aquest argument, manca realitzar la quantificació neuronal en el còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO amb marcadors pan-neuronals (NeuN) alhora que també detectar de manera específica les neurones CCK per determinar una plausible pèrdua neuronal.

En aquest sentit, prèviament en els ratolins Ndufs4KO es va demostrar la reducció en el nombre de neurones marcades amb NeuN en aquelles àrees cerebrals amb major neuroinflamació, en particular en el BO, nucli vestibular i cerebel (Quintana et al. 2010). Respecte a la determinació dels mecanismes causants de la pèrdua neuronal es va detectar un augment en els nivells de caspasa-8 activa (casp-8, proteasa clau en la via extrínseca apoptòtica) sense canvis en l'activació de la caspasa-9 (casp-9, associada a la via intrínseca) ni la caspasa-3 (casp-3, executora final d'ambdues vies apoptòtiques) (Quintana et al. 2010). Consegüentment, aquests resultats suggerien una activació inicial de la mort cel·lular per la via extrínseca però sense una materialització final de l'apoptosi a través de la via de les caspases (Elmore 2007). Els autors proposaven que la manca d'ATP en el context de la malaltia mitocondrial pot evitar l'execució final de l'apoptosi encaminant la cèl·lula a una mort per necrosi (Quintana et al. 2010; Denecker et al. 2001; Elmore 2007).

En referència a la necrosi, aquesta consisteix en un procés passiu i tòxic independent d'energia que afecta de manera generalitzada moltes cèl·lules, provocant-los modificacions morfològiques que inclouen un augment del volum cel·lular, canvis en els mitocondris, ruptura dels lisosomes i disrupció de la membrana plasmàtica (Nikoletopoulou et al. 2013; Fink and Cookson 2005). La pèrdua en la integritat de la membrana plasmàtica provoca l'alliberació del contingut citoplasmàtic a la zona extracel·lular enviant senyals per l'activació de cèl·lules inflamatòries. Contràriament, l'apoptosi és un procés controlat en el que no s'allibera el contingut



## Discussió

citoplasmàtic i la cèl·lula és fagocitada ràpidament per macròfags, evitant en gran mesura la resposta inflamatòria en el teixit (Nikoletopoulou et al. 2013; Elmore 2007). És per això que tenint en compte la resposta inflamatòria massiva present en el còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO, la necrosi sembla ser la via de mort cel·lular més probable en aquest context. No obstant, cal tenir en compte que un procés no és exclouent de l'altre. La hipòtesi de la necrosi es veu recolzada pels aparents canvis morfològics detectats específicament en les neurones CCK mitjançant l'epítot HA en el còrtex de ratolins Cck:RiboTag:Ndufs4cKO.

L'estudi morfològic tissular així com el marcatge histològic i els nivells proteics de marcadors apoptòtics (casp-3, casp-8, casp-9 o nuclis TUNEL-positius) (Elmore 2007) alhora que necròtics (RIPK1 i RIPK3) (Davidovich, Kearney, and Martin 2014) permetrien elucidar la naturalesa de la mort cel·lular en el context de la disfunció del CI mitocondrial en les neurones CCK.

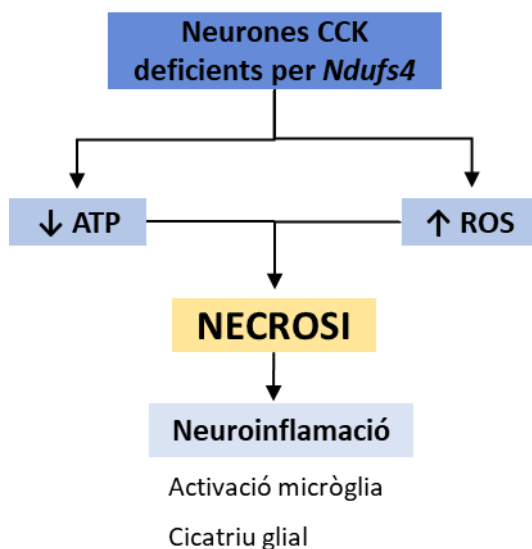
Tradicionalment, s'ha reconegut la mort cel·lular per necrosi com a desencadenant d'inflamació. L'activació de les cèl·lules del sistema immunitari s'assoleix amb molècules endògenes amb propietats semblants a citocines que en estat fisiològic no són alliberades per cèl·lules sanes, com per exemple IL-1 $\alpha$ , IL-33 o quimiocines (Westman, Grinstein, and Marques 2020). Aquestes citocines actuen com a potents activadores de diversos tipus cel·lulars, incloent macròfags, neutròfils o cèl·lules B (Davidovich, Kearney, and Martin 2014). La micròglia, els macròfags residents en el SNC, en estat d'activació es caracteritza per presentar una morfologia ameboide, ràpida proliferació i alliberació de gran quantitat de citocines, quimiocines i d'altres mediadors immunitaris per tal de desencadenar la resposta immunitària en la zona afectada (Subhramanyam et al. 2019; Ajami et al. 2007; Nakamura 2002).

Paral·lelament, com a resposta a un dany tissular intens i mort cel·lular, els astròcits també són activats (Maragakis and Rothstein 2006; Seifert, Schilling, and Steinhäuser 2006). Els astròcits responen amb canvis moleculars i morfològics progressius que s'engloben en el procés de la reactivitat astrogial, la qual desencadena en la

generació de nous astròcits proliferatius i la formació d'una cicatriu glial compacta en el casos més severes de dany tissular (Sofroniew 2009). La cicatriu glial es considera una barrera cel·lular que delimita les àrees amb gran inflamació per tal d'evitar la propagació de les cèl·lules immunitàries així com del possible agent infecció (Sofroniew 2009). En aquest sentit, existeix certa controvèrsia del paper beneficiós o bé perjudicial de l'astroglíosis en la recuperació del teixit afectat (Swanson, Ying, and Kauppinen 2004; Adams and Gallo 2018).

En conjunt, la deficiència de la subunitat mitocondrial NDUFS4 en les neurones CCK del còrtex pot generar un estat metabòlic vulnerable en aquestes neurones, causat per estrès oxidatiu i depleció en l'ATP, que desencadeni en necrosi progressiva. A la vegada, la mort neuronal incontrolada per necrosi pot ser el principal mecanisme d'activació de cèl·lules del sistema immunitari resident, tal com es detecta en la histologia amb l'augment del marcatge d'Iba1 (micròglia). A més a més, la mort cel·lular i el dany tissular prolongat determina la formació d'una cicatriu glial que possiblement encara dificulti més la recuperació neuronal (Figura 52).

La progressió de la gliosi al llarg dels mesos en el còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO pot esdevenir un bon model per l'estudi de la neuroinflamació i posterior mort neuronal en el context de les malalties mitocondrials d'una manera dilatada en el temps, la qual cosa no és viable amb la reduïda esperança de vida dels ratolins Ndufs4KO (Kruse et al. 2008; Quintana et al. 2010). A propòsit d'això, les lesions analitzades *post mortem* en pacients de la SL poden ser classificades en 3 categories en funció de la severitat del dany descrit i correlacionades amb el moment de l'aparició de la lesió (Cavanagh and Harding 1994). Per tant, les lesions graduals presentades en els animals Cck:Ndufs4cKO podrien convertir-se en un model de les diferents fases en l'evolució del dany neuronal en l'àmbit de les malalties mitocondrials.



**Figura 52. Possibles mecanismes desencadenats de neuroinflamació en el context de la disfunció mitocondrial en les neurones CCK en el còrtex parietal de ratolins *Cck:Ndufs4cKO*.** La disfunció mitocondrial provoca alteracions metabòliques en les neurones, com una reducció en els nivells d'ATP i un augment en ROS, mecanismes que poden desencadenar en mort cel·lular per necrosi. L'alliberació descontrolada del contingut citoplasmàtic pot activar la resposta inflamatòria i el dany tissular promou la formació de la cicatriu glial.

#### 4. L'estrès oxidatiu com a possible estímul nociu a nivell tissular i iniciació de la resposta neuroinflamatòria degut a la deficiència del gen *Ndufs4* en neurones CCK

En el context de la disfunció mitocondrial en les neurones CCK, la hipòtesi mencionada anteriorment, per la qual es proposa l'augment de ROS i la disminució en els nivells d'ATP com a possibles desencadenants de la mort neuronal per necrosi i activant massivament la resposta inflamatòria, es veu recolzada pels diferents transcrits detectats amb expressió augmentada en el còrtex parietal de ratolins *Cck:RiboTag:Ndufs4cKO*.

En aquest sentit, l'anàlisi comparatiu del transcriptoma de mostres *Cck:RiboTag:Ndufs4cKO* ( $Input_{cKO}$ ) amb mostres control ( $Input_{cCT}$ ) va detectar 4 transcrits diferencialment expressats als 6 mesos d'edat: *Txnip*, *Hspa1b*, *Cd93* i *Thbd*. La detecció d'aquests transcrits, encara que representen un nombre reduït de gens,

posen de manifest que la disfunció mitocondrial, tot i ser específica en les neurones CCK, provoca alteracions en l'expressió gènica a nivell tissular i possiblement en altres tipus cel·lulars diferents de les pròpies neurones CCK, tal com succeeix amb l'expressió predominant de *Cd93* i *Thbd* en cèl·lules endotelials (Conway 2012; Danet et al. 2002; Nepomuceno and Tenner 1998).

En primer lloc, TXNIP (proteïna d'interacció amb tioredoxina) és un sensor d'estrès cel·lular, la síntesi del qual es veu augmentada per diferents estímuls estressants tals com nivells elevats de ROS, concentracions altes de glucosa o increment de temperatura (Junn et al. 2000; Nasoohi, Ismael, and Ishrat 2018; Minn, Hafele, and Shalev 2005). En concret, l'augment de TXNIP provocat per ROS regula la resposta inflammatòria en diferents tipus cel·lulars a través de la unió de TXNIP amb el complex inflamàsoma NLRP3 (Gao et al. 2015; Nasoohi, Ismael, and Ishrat 2018), escenari plausible tenint en compte la disfunció mitocondrial en les neurones CCK. A més a més, diferents estudis apunten a un augment en l'expressió de TXNIP en diferents malalties neurodegeneratives i cerebrovasculars com la malaltia d'Alzheimer o la isquèmia (Ishrat et al. 2015; Y. Wang et al. 2019; Tsubaki, Tooyama, and Walker 2020), esdevenint un possible objectiu pel tractament de malalties del SNC.

En segon lloc, la proteïna HSPA1B (proteïna de xoc tèrmic de la família A membre 1B) forma part de la família de xaperones Hsp70, la funció de les quals és unir-se a proteïnes mal plegades, afavorir el seu correcte plegament i evitar-ne l'agregació (Radons 2016). L'expressió augmentada del transcrit *Hspa1b* en les mostres *Input*<sub>cKO</sub> pot ser deguda als hipotètics nivells alts de ROS, ja que la síntesi d'aquestes xaperones es veu augmentada com a resposta a diferents estímuls estressants entre els quals destaquen l'estrès oxidatiu, la temperatura o la presència de metalls pesats (Turturici, Sconzo, and Geraci 2011). La inducció de la seva síntesi assenjala l'existència d'un estímul nociu en el teixit, en aquest cas l'estrès oxidatiu, el qual intenta contrarestar la cèl·lula assegurant el plegament correcte de les proteïnes naixents. En certes condicions patològiques de malalties relacionades amb el SNC,

com la malaltia d'Alzheimer, de Parkinson o l'atàxia espinocerebelosa, la maquinària de control de qualitat proteica no és suficient per evitar l'acumulació de proteïnes mal plegades, situació que desemboca en pèrdua neuronal (Kakizuka 1998; Muchowski and Wacker 2005), tot i la funció anti-apoptòtica que exerceixen les xaperones (F. Guo et al. 2005; X. Yang et al. 2012).

En darrer lloc, els gens *Cd93* i *Thbd* (*Cd141*) formen part de la mateixa família de glicoproteïnes transmembrana, localitzats principalment en cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis però també en neurones, astròcits, micròglia o diferents cèl·lules immunitàries (Danet et al. 2002; Nepomuceno and Tenner 1998; Conway 2012; Wong et al. 1991) i estan descrites per dur a terme diferents funcions en la inflamació i l'angiogènesi (Khan et al. 2019). Per una banda, un model d'inflamació induït per LPS (lipopolisacàrids) en rata va demostrar un increment en la síntesi de CD93 (antigen de diferenciació 93) específicament en micròglia i neurones després de la inducció inflamatòria seguit d'una reducció en la seva expressió (Liu et al. 2014). Tenint en compte que en el còrtex parietal dels ratolins *Cck:Ndufs4cKO* de 6 mesos s'ha detectat activació de la micròglia juntament amb astrogliosi histològicament, aquests esdeveniments podrien ser els causants de l'augment en l'expressió de *Cd93*. A més a més, en ratolins els nivells de *Cd93* també es veuen augmentats després d'un episodi d'isquèmia cerebral focal transitòria, suggerint una funció neuroprotectora de CD93 a través de la supressió de la resposta neuroinflamatoria, ja que la seva absència causa un augment de l'edema, un volum d'infart major i més infiltració de leucòcits en el cervell (Harhausen et al. 2010). Per altra banda, *Thbd* (trombodulina) o *Cd141* (antigen de diferenciació 141) actua com a protector davant l'estrès ja que regula i integra diferents processos biològics incloent inflamació, immunitat innata, proliferació cel·lular i coagulació, mitjançant la unió amb lligands com trombina o proteïna C (Conway 2012). A més a més, la funció de la THBD es veu regulada davant mediadors inflamatoris gràcies a la seva endocitosis (Martin, Murphy, and Cummins 2013; Maruyama and Majerus 1985).

En conjunt, els 4 gens detectats amb expressió augmentada en les mostres *Input<sub>CKO</sub>* apunten a l'estrès oxidatiu com a principal procés cel·lular alterat juntament amb l'inici de la resposta inflamatòria en el còrtex parietal.

## **5. El còrtex parietal com a àrea primària lesionada en els ratolins Cck:Ndufs4cKO**

Les imatges de RM aporten informació decisiva de les alteracions en l'anatomia cerebral en el cas de patologia, però és juntament amb l'historial clínic del pacient i diferents proves bioquímiques les que permeten determinar-ne un diagnòstic clar. En el cas de la SL, es detecten senyals d'hiperintensitat en les imatges de T2w localitzades en el tronc de l'encèfal i/o ganglis basals de manera bilateral i simètrica (Bricout et al. 2014; Lake et al. 2015) així com una disminució en els valors d'ADC en el centre de les lesions (Cecchini et al. 2007). No obstant, senyals hiperintenses en T2w poden aparèixer com a causa de gran quantitat de processos, com hemorràgia, isquèmia, tumors, infecció o inflamació (Guzmán-De-Villoria, Fernández-García, and Ferreiro-Argüelles 2010; Yousaf, Dervenoulas, and Politis 2018), dificultant determinar l'origen de les anomalies de senyal en les lesions de la SL (Walker et al. 2022).

A nivell cel·lular, la formació de les lesions en la SL és el resultat de la contribució de diferents factors, els quals s'originen amb la disfunció de la OXPHOS alhora que amb la reducció en els nivells d'ATP. Aquest escenari desencadena en una gliosi crònica, la qual causa hipertròfia i proliferació vascular, aparició de vacuoles en el neuropil i desmielinització en el centre de les lesions (Lake et al. 2015; Leigh 1951; van Erven et al. 1987). Tots aquests processos cel·lulars poden contribuir a la detecció de senyals hiperintenses en les imatges de T2w i disminució de la difusió.

Per la seva part, els mapes d'ADC permeten quantificar la difusió de les molècules d'aigua en un teixit (Yousaf, Dervenoulas, and Politis 2018). Tal com s'observa en el

còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO, una disminució en els valors d'ADC implica un augment en la restricció de l'aigua degut a que les cèl·lules incrementen el flux d'aigua a l'espai intracel·lular, conegut com a edema citotòxic (Filippi and Agosta 2016; Loubinoux et al. 1997). Una disminució en els nivells d'ATP cel·lulars, escenari probable en el context de les malalties mitocondrials (Lake et al. 2015), pot alterar el transport actiu dependent d'energia de ions, pel qual el Na<sup>+</sup> juntament amb altres cations extracel·lulars s'acumulen en les neurones. Per la seva banda, l'entrada de cations provoca el flux d'anions extracel·lulars per tal de mantenir la neutralitat elèctrica, que al seu torn desencadena l'entrada d'aigua en la cèl·lula per osmolaritat, provocant finalment un augment en el volum cel·lular o edema citotòxic (Liang et al. 2007). Quan els mecanismes compensatoris com les bombes iòniques de la membrana plasmàtica no assoleixen revertir el flux de ions i aigua, es pot produir mort cel·lular deguda a l'augment del volum de la cèl·lula (Szabó 2005; Liang et al. 2007).

Els ratolins Cck:Ndufs4cKO, tot i no mostrar alteracions en les àrees cerebrals característiques de la SL, presenten senyals hiperintenses en imatges de T2w i disminució d'ADC en el còrtex parietal de manera progressiva, incloent M1, M2 i S1HL. Aquestes lesions corticals detectades amb neuroimatges es correlacionen amb aquelles àrees amb neuroinflamació severa observades histològicament. L'expansió progressiva de les àrees corticals afectades va en consonància amb el que es detecta en les imatges de RM en aquells pacients amb SL quan esdevenen simptomàtics o bé pateixen una crisi metabòlica, en els quals augmenten de volum les zones danyades (Baertling et al. 2016). Curiosament, als 12 mesos d'edat el volum afectat en el còrtex dels ratolins Cck:Ndufs4cKO en les imatges de T2w es manté inalterat respecte als volums registrats prèviament. Aquests resultats, junt amb un canvi en el patró de difusió observat en els mapes d'ADC, apunten a una possible regressió del teixit cortical motivat per l'atròfia cerebral, la qual es discuteix posteriorment.

Pel que fa al tàlem, el qual mostra nivells alts d'expressió de *Cck* (Lein et al. 2007) però amb absència de neuroinflamació, registra alteracions en les senyals de T2w juntament amb una reducció de la difusió als 6 i 9 mesos d'edat en els ratolins *Cck:Ndufs4cKO*. Probablement aquestes dades apunten a una lesió primària en el tàlem degut a la presència de neurones CCK amb disfunció mitocondrial. L'àrea cerebral de l'estriat, analitzada degut a l'absència d'expressió de *Cck* (Lein et al. 2007), no presenta canvis en el temps de relaxació T2 en cap punt temporal en els animals *Cck:Ndufs4cKO* per bé que mostra una disminució en la difusió als 6 i 9 mesos d'edat. Aquests resultats, juntament amb l'absència de neuroinflamació aparent, suggereixen que l'estriat esdevé afectat de manera secundària presumiblement degut a l'alteració de les projeccions procedents d'una escorça cerebral afectada (Molyneaux et al. 2007).

La possible necrosi en el cervell dels ratolins *Cck:Ndufs4cKO* és detectada amb una senyal hiperintensa en imatges T2w i delimitada per la cicatriu glial, per contra, els mapes d'ADC mostren l'existència d'edema citotòxic en un territori anatòmic major (còrtex temporal, estriat i tàlem), actuant com a predictor de l'evolució de la lesió. En conjunt, per tant, considerem el còrtex parietal com l'àrea neuroanatòmica on s'inicia una possible lesió derivada de la disfunció mitocondrial en les neurones CCK, associada a neuroinflamació progressiva i detectada en imatges de RM. Altres àrees cerebrals, esdevenen alterades de manera secundària com indica la limitació de la seva afectació a etapes avançades de la patologia sense canvis anatòmics i neuroinflamació lleu.

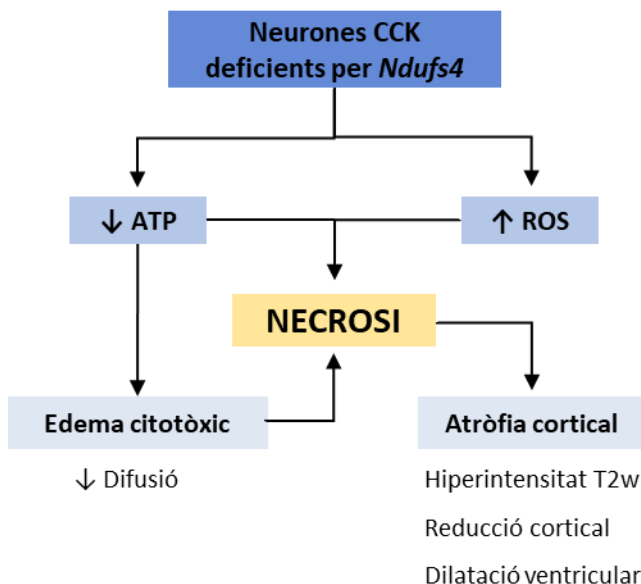
En base als estudis clínics i les autòpsies realitzades en pacients amb SL, és apropiat descartar hemorràgies, isquèmia, neoplàsia i infecció com a causants de les alteracions de les senyals de T2w (Cavanagh and Harding 1994). Així mateix, el cervell dels ratolins *Cck:Ndufs4cKO* presenten absència d'hemorràgies aparents en les imatges de T2\*w alhora que inexistència d'alteracions en el flux sanguini per perfusió, descartant una condició isquèmica amb preservació de la barrera



hematoencefàlica. Globalment, la disfunció mitocondrial en les neurones CCK causa en primer lloc un edema citotòxic amb acumulació d'aigua en l'espai intracel·lular, detectat per una disminució en els mapes d'ADC, i en segon lloc una necrosi descontrolada registrada amb senyals hiperintenses en imatges T2w (Figura 53).

A més a més, els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* presenten modificacions en la neuroanatomia cerebral, com són un engrandiment dels ventricles laterals alhora que una reducció en el gruix cortical als 9 i 12 mesos d'edat. Per una banda, alteracions en el gruix cortical s'associen amb neuropatologies i condicions neurològiques com la malaltia d'Alzheimer, l'esquizofrènia o l'epilèpsia (Hutton et al. 2008). Per altra banda, en alguns pacients amb SL s'ha reportat un engrandiment dels ventricles (Horváth et al. 2006; Ostergaard et al. 2007; Leigh 1951), així com en la malaltia d'Alzheimer, entre d'altres malalties neurodegeneratives en etapa avançada (Nestor et al. 2008).

En nounats es descriu una patologia amb dilatació dels ventricles cerebrals com a ventriculomegalia fetal, la qual pot estar causada per atròfia cerebral, producció excessiva de líquid cefalorraquidi (CSF) o obstrucció de les vies del CSF (Pisapia et al. 2017; McKechnie, Vasudevan, and Levene 2012). En el cas de l'atròfia cerebral es produeix pèrdua de teixit cerebral, condició en la que els ventricles ocupen l'espai originat donant una aparença de dilatació. S'ha descrit atròfia cerebral en les zones lesionades de pacients de la SL (Bricout et al. 2014; Cavanagh and Harding 1994), així com en d'altres desordres metabòlics, infeccions, infart o hipòxia cerebral (McKechnie, Vasudevan, and Levene 2012; Pisapia et al. 2017). Per tant, les alteracions neuroanatòmiques presents en els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* juntament amb la bibliografia suggereixen que la disfunció mitocondrial en neurones CCK pot causar atròfia cerebral amb reducció del gruix cortical amb la conseqüent dilatació dels ventricles laterals (Figura 53).



**Figura 53. Possible escenari generat per la disfunció mitocondrial en les neurones CCK a nivell cel·lular i tissular en el còrtex parietal de ratolins *Cck:Ndufs4cKO*.** La disfunció mitocondrial provoca alteracions metabòliques en les neurones, com una reducció en els nivells d'ATP i un augment en ROS, mecanismes que poden desencadenar en mort cel·lular per necrosi. Per la seva part, nivells baixos d'ATP impedirien el manteniment de l'osmolaritat cel·lular provocant l'acumulació d'aigua intracel·lular (edema citotòxic), el qual és detectat en imatges de RM com una disminució en la difusió. A més a més, el procés de necrosi pot causar atròfia cortical, que es detecta amb senyals d'hiperintensitat en T2w així com dilatació ventricular per compensar la pèrdua tissular.

## 6. Reducció de les capes corticals superiors en ratolins *Cck:Ndufs4cKO*

El marcatge histològic de les neurones de projecció localitzades en les capes corticals profundes 5 i 6 amb anticossos contra la proteïna CTIP2 va posar de manifest una reducció significativa en el gruix de les capes corticals superiors (CCS) així com de manera general del còrtex en ratolins *Cck:Ndufs4cKO* als 9 i 12 mesos d'edat. Cal mencionar que aquest tipus de marcatge permet la localització del soma neuronal, no obstant, les dendrites i axons d'aquestes neurones poden estar ubicats en altres capes corticals, en les quals estableixen sinapsis (Larkum et al. 2018).

## Discussió

Aquesta reducció de les capes corticals superiors (capes 1 i 2/3) derivada de la deficiència mitocondrial pot ser interpretada per dues hipòtesis: en primer lloc, podria ser que les neurones CCK de capes superiors presentessin requeriments energètics i funcions característiques que les fessin més vulnerables a la disfunció mitocondrial conduint-les a la mort cel·lular i en segon lloc, podria donar-se una compactació específica de les CCS derivada de la dilatació dels ventricles però sense pèrdua neuronal. Una possibilitat per discernir entre aquestes dues hipòtesis seria el marcatge específic de les CCS, tant prèviament a les lesions com posteriorment, amb anticossos contra les proteïnes Reelin o CUX1 (*Cut like homeobox 1*) (Hevner 2007; Weiss and Nieto 2019), per tal de determinar la possible disminució d'aquests tipus neuronals o bé si es localitzen de manera compactada en la zona dorsal del còrtex.

En el supòsit que es produís una pèrdua específica de les neurones ubicades en les CCS, existeix certa controvèrsia en el fet de si la laminació cortical aporta característiques funcionals diferenciades en el processament cortical (Adesnik and Naka 2018). En aquest sentit, els models murins amb una desorganització completa de les capes corticals (ratolí *reeler*) únicament presenten un dèficit subtil en el processament sensorial (Guy and Staiger 2017), mentre que el nombre de neurones i les connexions que estableixen estan preservades, suggerint doncs que la localització de les neurones en les diferents capes per si mateixes no serien crítiques en el processament de la informació i caldria posar el focus en els tipus cel·lulars funcionals juntament amb les connexions que formen.

El neuropèptid CCK s'expressa de manera força uniforme en totes les capes corticals, a excepció de la capa 5 en el còrtex temporal (Lein et al., 2007). Tanmateix, el perfil transcripcional, les característiques electrofisiològiques i les àrees de projecció de les neurones CCK en les diferents capes corticals és divers (Fuzik et al. 2016). En aquest sentit, en les CCS es registra que >65% de les neurones CCK co-expressa el marcador d'interneurones GABAèrgiques GAD67. Contràriament, aquesta tendència

es reverteix en les capes corticals més profundes, on predominen les neurones CCK-glutamatèrgiques (Calvigioni et al. 2017). Les CCK<sup>INT</sup> de la capa 1 presenten múltiples característiques morfològiques, algunes interneurons projecten els seus axons exclusivament a la mateixa capa 1 mentre que d'altres ho fan a la capa 2 i 4, presentant variabilitat en la morfologia dels arbres dendrítics i axonals (Fuzik et al. 2016).

Un aspecte que podria afegir vulnerabilitat a les neurones CCK-glutamatèrgiques de les CCS és el patró de projeccions i connexions que presenten aquestes capes corticals, els axons de les quals projecten especialment en el còrtex contra-lateral (Leone et al. 2008; Molyneaux et al. 2007). Aquesta característica fa que en els animals *Cck:Ndufs4cKO*, les neurones ubicades en les CCS rebin i generin estímuls principalment d'àrees cerebrals afectades per la disfunció mitocondrial, actuant com una retroalimentació perjudicial en les funcions de les neurones CCK.

## **7. Expressió de marcadors glutamatèrgics en una fracció abundant de neurones CCK**

Per tal d'identificar possibles alteracions transcripcionals induïdes per la deficiència del gen *Ndufs4* en les neurones CCK es va seqüenciar específicament el traductoma d'aquesta població neuronal mitjançant l'assaig RiboTag (Sanz et al. 2009). Aquesta tècnica permet analitzar els mRNA associats a ribosomes en tipus cel·lulars definits genèticament preservant la fisiologia del sistema. L'especificitat de l'assaig RiboTag depèn de l'especificitat en l'expressió de la recombinasa Cre de la línia transgènica de ratolí utilitzada. En aquest sentit, la línia de ratolí *Cck-IRES-Cre* emprada en la present tesi doctoral ha estat validada amb una expressió de Cre específica i eficient en neurones CCK positives (Taniguchi et al. 2011).

L'èxit de la tècnica RiboTag es pot determinar mitjançant qRT-PCR avaluant l'enriquiment dels mRNA específics de la població cel·lular d'interès (Sanz et al.

2019). En aquest sentit, es va detectar un enriquiment del transcrit *Cck* en la fracció immunoprecipitada corresponent a les neurones CCK en comparació a la mostra *Input*, confirmant l'especificitat en l'aïllament dels ribosomes procedents de la població neuronal d'interès. Curiosament, el canvi relatiu en els nivells d'enriquiment de *Cck* oscil·laven de 1,5-1,8 en el còrtex parietal i de 2,1-2,5 en el còrtex temporal, valors que, tot i ser significativament superiors al *Input*, suggeririen nivells baixos d'enriquiment. Aquests resultats es podrien relacionar amb la gran abundància de les neurones CCK en les àrees disseccionades (Whissell et al. 2015). Nivells elevats d'expressió del transcrit *Cck* a nivell cortical (*Input*) dificultarien l'obtenció d'un gran enriquiment tot i immunoprecipitar específicament aquesta població neuronal. El mateix succeeix en aïllar específicament la població neuronal CamK2a-positiva altament abundant en l'hipocamp, on es detecta un enriquiment proper a 2 vegades per la població neuronal d'interès (Sharma et al. 2020), mentre que en la població neuronal dopaminèrgica (DAT, *Slc6a3*) molt restringida de l'hipotàlem, s'assoleixen nivells d'enriquiment de 10-15 vegades (Sanz et al. 2009). Tot això és degut a que la tècnica RiboTag es basa en la comparació de l'expressió gènica entre dues mostres (IP vs *Input*), on la fracció IP s'obté a partir de l'*Input*.

Paral·lelament, en la població CCK es va detectar un enriquiment dels transcrits glutamatèrgics (*Slc17a6* i *Slc17a7*) alhora que una depleció pels GABAèrgics (*Gad1* i *Gad2*) respecte l'*Input*, tant en el còrtex parietal com temporal. Aquests resultats suggereixen que una part significativa de les neurones CCK presenten expressió de marcadors glutamatèrgics, mentre que una fracció més reduïda de neurones CCK expressen marcadors GABAèrgics. Aquestes dades estan en consonància amb la localització de CCK tant en neurones piramidals (glutamatèrgiques) com en interneurons (GABAèrgiques) en el còrtex de ratolins (Taniguchi et al. 2011). No obstant, mancava quantificar el percentatge de neurones CCK amb expressió de marcadors glutamatèrgics i/o GABAèrgics. A la vegada, el transcrit *Pvalb* es va detectar deplecionat en la població CCK, descartant la co-expressió dels dos

marcadors en la majoria d'aquestes neurones. Per últim, l'especificitat de l'aproximació RiboTag es va confirmar amb una depleció de 40 vegades pel transcrit d'oligodendròcits *Cnp* en la mostra IP.

La disfunció mitocondrial específica en neurones CCK va ser confirmada en mostres IP d'animals *Cck:RiboTag:Ndufs4cKO* amb una marcada depleció del transcrit *Ndufs4*, mentre que les mostres control van exhibir una reducció del 50% del transcrit degut a presentar la mutació de *Ndufs4* en heterozigosi. La meitat del contingut de la subunitat NDUF54 és suficient per permetre un desenvolupament sense alteracions, tal com s'evidencia en el patró d'herència autosòmica recessiva en pacients de malalties mitocondrials (Fassone and Rahman 2012), en el ratolí *Ndufs4KO* heterozigot (Kruse et al. 2008) i en els anàlisis aquí presentats amb els ratolins *Cck:Ndufs4cCT* i *Pvalb:Ndufs4cCT*.

## **8. La deficiència del gen *Ndufs4* en neurones CCK provoca canvis en l'estructura del citoesquelet neuronal compatibles amb pèrdua sinàptica**

L'estudi del traductoma de les neurones CCK del còrtex parietal (IP<sub>cKO</sub>) deficientes per NDUF54 va demostrar canvis subtils a nivell molecular en detectar una desena de gens amb expressió diferencial, tot i que els primers signes de neuroinflamació ja eren observables als 6 mesos. Aquests resultats suggereixen que l'etapa temporal seleccionada per analitzar el perfil genètic de les neurones CCK era massa primerenca a la lesió com per detectar-ne alteracions. Tanmateix, es van escollir els 6 mesos amb l'argument d'evitar la pèrdua neuronal de la població cel·lular d'interès. La disfunció del CI mitocondrial en neurones CCK va alterar els nivells de diversos transcrits relacionats amb el citoesquelet i la matriu extracel·lular incloent *Cdh13*, *Cip4*, *Col6a2*, *Itga11*, *Pcdha8* i *Ppp1r18*.

Els mitocondris tenen un paper essencial en l'activitat sinàptica, ja que en produeixen l'ATP necessari i regulen l'homeòstasi del  $Ca^{2+}$  (Devine and Kittler 2018).

Això requereix una distribució i transport característics dels mitocondris en els diferents compartiments neuronals, gràcies a la precisa regulació de diferents components del citoesquelet neuronal (Cardanho-Ramos, Faria-Pereira, and Morais 2020; Bodakuntla et al. 2021). A més a més, la distribució dels mitocondris juga un paper clau en la generació i manteniment a llarg termini de la complexitat neuronal per tal de processar la informació en el cervell (MacAskill and Kittler 2010). En aquest context, un estudi va demostrar que la deleció d'una proteïna cabdal en el transport mitocondrial en les neurones (Miro1) de ratolins, provocava una reducció dels mitocondris en les dendrites i una pèrdua de complexitat dendrítica que a la vegada va desencadenar en mort neuronal semblant a un procés neurodegeneratiu. La mort neuronal va causar canvis en l'estructura del cervell d'aquests ratolins, registrant una reducció en la mida del còrtex i de l'hipocamp (López-Doménech et al. 2016). Addicionalment, el transport mitocondrial en les neurones requereix una fusió i fissió constants del mitocondris, processos en els quals participen els microtúbuls i el citoesquelet d'actina (Sheng and Cai 2012).

En conjunt, totes aquestes evidències suggereixen que la presència de mitocondris vulnerables en les neurones CCK degut a la disfunció del CI podria modificar tant la dinàmica mitocondrial com el transport d'aquests orgànuls en els compartiments neuronals amb alts requeriments energètics. Una reducció de la presència de mitocondris en axons i dendrites alteraria la formació de sinapsis i ramificacions degut a la manca d'ATP, possiblement modificant l'estructura del citoesquelet, tal com s'evidencia amb els transcrits DAR en les neurones CCK. Paral·lelament, es podria atribuir la reducció dendrítica i de sinapsis amb l'eventual mort de les neurones CCK. Per contra, en el còrtex temporal l'absència de canvis en l'expressió gènica comparant mostres  $IP_{CKO}$  amb  $IP_{CCT}$  es correlacionen amb la manca de neuroinflamació histològica i postula novament el còrtex temporal com a àrea amb afectació secundària.

## 9. Una organització sinàptica diferencial entre neurones CCK del còrtex parietal i temporal pot ser clau en la vulnerabilitat mitocondrial

Les neurones CCK estan àmpliament distribuïdes per tot el còrtex cerebral (Whissell et al. 2015), no obstant existeix una gran complexitat en el seu perfil genètic, patró electrofisiològic i connexions sinàptiques (Fuzik et al. 2016). Aquesta hipòtesi s'ha evidenciat davant la deficiència del gen *Ndufs4*, escenari en el que les neurones CCK<sup>CxP</sup> han mostrat una major vulnerabilitat davant la disfunció mitocondrial, tant a nivell del perfil d'expressió gènica com histològic. Tot això posa en relleu la importància dels estudis amb especificitat cel·lular en un context tissular.

Una qüestió a resoldre és determinar genèticament què caracteritza les neurones CCK<sup>CxP</sup> respecte les CCK<sup>CxT</sup> per esdevenir susceptibles a la disfunció mitocondrial. En aquest sentit, es van detectar 2532 transcrits DAR en les mostres control, els quals estan involucrats principalment en processos biològics relacionats amb la sinapsis, com la seva organització, activitat o regulació de les vesícules sinàptiques, desenvolupament axonal i projeccions neuronals. Aquests resultats indiquen que els mecanismes pels quals les neurones CCK<sup>CxP</sup> estableixen les sinapsis per tal de processar i transmetre la informació divergeixen significativament dels mecanismes emprats per les neurones CCK<sup>CxT</sup>.

La connectivitat i la funcionalitat de les xarxes neuronals està determinada per on i quan es formen les sinapsis. L'especificitat en la formació de les sinapsis requereix la coordinació de diferents processos, incloent creixement dendrític, direcció axonal, migració cel·lular, reorganització del citoesquelet, selecció sinàptica de cèl·lules diana i sinaptogènesi (Waites, Craig, and Garner 2005; Jüttner and Rathjen 2005). Generalment, la neurona presinàptica presenta gran quantitat de vesícules sinàptiques amb neurotransmissors, els quals són alliberats en l'espai intersinàptic i detectats pels receptors ubicats en la neurona postsinàptica, on s'activen senyals moleculars, s'obren canals iònics i es propaga l'impuls nerviós (Colón-Ramos 2009; Südhof 2021). Per bé que aquests són els components clàssics en la formació de la



sinapsi, cada vegada apareixen més estudis indicant la diversitat sinàptica existent. Aquesta idea és recolzada per les més de 1000 proteïnes descrites que participen en la sinapsi, les quals s'expressen amb diferents combinacions creant multitud de tipus de sinapsis amb una distribució concreta al llarg del cervell (Grant 2019; Bayés et al. 2012). Les àrees cerebrals relacionades amb funcions cognitives mostren una major diversitat sinàptica, incloent l'hipocamp i el còrtex cerebral, a més de presentar un patró diferencial de sinapsis en les capes corticals (F. Zhu et al. 2018). Aquesta gran diversitat sinàptica en el còrtex recolza els resultats obtinguts en la comparació gènica de les neurones CCK<sup>CxP</sup> respecte les neurones CCK<sup>CxT</sup> on diversos processos biològics relacionats amb la sinapsi es detecten com a diferencials entre les dues àrees neuroanatòmiques analitzades. Eventualment, és plausible que les neurones CCK<sup>CxP</sup> tinguessin més dependència de l'energia mitocondrial en base al tipus de sinapsis que estableixen, fent-les per tant més vulnerables a la disfunció mitocondrial.

Paral·lelament, es va observar una tendència semblant en els processos biològics específics de les neurones CCK<sup>CxP</sup> respecte les CCK<sup>CxT</sup> en el context de la disfunció mitocondrial. Si bé és cert que es va observar una reducció en el nombre de transcrits DAR (1559) en les mostres IP<sub>CKO</sub> en comparació als controls, les principals vies implicades estaven vinculades novament amb l'organització i senyalització sinàptica, alhora que amb el transport i nivells de neurotransmissors i ions. Per tant, globalment la deficiència del gen *Ndufs4* no va contribuir amb grans canvis en el perfil traduccional de les neurones CCK en la comparació del CxP amb el CxT.

### **10. Les lesions corticals contribueixen en gran part a les alteracions fisiològiques i conductuals detectades en els ratolins Cck:Ndufs4cKO**

L'estudi fenotípic dels ratolins Cck:Ndufs4cKO ha posat en relleu la importància de la població neuronal CCK i de l'àrea neuroanatòmica del còrtex en el context de les malalties mitocondrials. Tot i la complexitat del fenotip desenvolupat en l'absència

del gen *Ndufs4*, la major part de les alteracions conductuals es poden correlacionar amb diferents zones corticals, com són el còrtex motor o el còrtex prefrontal, així com les projeccions que se'n deriven cap a la resta del cervell i la medul·la espinal. Addicionalment, l'inici de la detecció de les lesions corticals tant per histologia com per RM se sol correspondre amb l'aparició dels canvis fisiològics i conductuals.

A nivell fisiològic, es van detectar alteracions en el patró respiratori dels ratolins *Cck:Ndufs4cKO*, concretament amb una reducció en el volum d'aire inspirat i expirat en cada cicle respiratori (volum corrent). Els problemes respiratoris són descrits com la principal causa de mort en els pacients amb SL (Sofou et al. 2014), alhora que estan presents tant en el model animal amb deficiència constitutiva de *Ndufs4* (*Ndufs4KO*) (Quintana, Zanella, et al. 2012) com en el model amb deleció específica en neurones glutamatèrgiques (*Vglut2:Ndufs4cKO*) (Bolea et al. 2019), considerats en ambdós casos els desencadenants de la mort prematura en els animals. No obstant, les característiques de les alteracions respiratòries registrades tant en els ratolins *Ndufs4KO* com *Vglut2:Ndufs4cKO* divergeixen de les detectades en els ratolins *Cck:Ndufs4cKO*, ja que els dos primers casos mostren un augment del volum corrent mentre que en l'últim cas se'n registra una disminució. Tot i així, podríem suposar que la reducció en la supervivència dels ratolins *Cck:Ndufs4cKO* està en part lligada a les alteracions respiratòries que presenten. En els mamífers, el control de la respiració es duu a terme en el bulb raquidi, ubicat en la part dorsal del tronc de l'encèfal, i està organitzat en el grup respiratori parafacial i el complex pre-Bötzinger (Ikeda et al. 2017; Muñoz-Ortiz et al. 2019; Pisanski and Pagliardini 2019). Aparentment, aquesta àrea cerebral no presenta neuroinflamació en els animals *Cck:Ndufs4cKO* tot i que no se'n poden descartar alteracions funcionals degut a la detecció de *Cck* tant per hibridació *in situ* com per seqüenciació en el complex pre-Bötzinger (Lein et al. 2007; Hayes et al. 2017).

L'anàlisi de l'activitat motora i l'equilibri és cabdal en l'estudi d'un model animal de malaltia mitocondrial, ja que les afectacions motores són els signes clínics més

freqüents en pacients amb SL (Sofou et al. 2014) així com es manifesten en animals model de la malaltia (Kruse et al. 2008; Spinazzi et al. 2019). En aquest sentit, es va evidenciar una alteració en la coordinació motora i equilibri dels animals Cck:Ndufs4cKO a partir dels 8 mesos d'edat detectada en una barra giratòria (*rotarod*) i en descendir per un llistó en vertical, edat en la qual es feia evident la lesió cortical per mitjà d'histologia i RM. La coordinació motora es veu greument afectada en animals model amb atròfia en el cerebel (Vogel et al. 2007), àrea neuroanatòmica sense neuroinflamació aparent en els ratolins Cck:Ndufs4cKO. No obstant, l'existència de projeccions directes entre el cerebel i M1 o a través d'alguns nuclis del tàlem per tal de controlar el moviment (D'Angelo 2018; Manto et al. 2012; Spampinato, Celnik, and Rothwell 2020) podrien explicar les alteracions en la coordinació i equilibri registrades en els ratolins Cck:Ndufs4cKO. A més a més, es detecten canvis en el patró de resposta de les neurones del còrtex motor d'aquells ratolins sotmesos al *rotarod* (Costa, Cohen, and Nicoletis 2004) o bé entrenats en una roda giratòria (Yue et al. 2021), evidenciant la implicació d'aquesta àrea cerebral en la coordinació motora.

Tanmateix, els dèficits motors presentats pels ratolins Cck:Ndufs4cKO no van influir en la seva activitat locomotora en un espai obert, posant de manifest que la descoordinació motora i pèrdua d'equilibri només s'advertien en aquelles tasques que requerien més precisió, com és el cas del *rotarod* o descendir per un llistó en vertical. Així mateix, el test de l'espai obert també permet obtenir informació de l'estat d'ansietat dels ratolins mesurant el temps destinat en el centre de la caixa (Bale et al. 2000; Krauter, Guest, and Sarnyai 2019a), el qual no es va veure alterat en els animals Cck:Ndufs4cKO. Tanmateix, pel que fa l'estudi de l'ansietat s'haurien d'aplicar altres proves tals com el test elevat (*elevated plus maze*) o bé el test dels compartiments llum/fosc ( *light/dark box*) per tal d'extreure una conclusió més robusta pel que fa a un comportament d'ansietat (Komada, Takao, and Miyakawa 2008; Kuleskaya and Voikar 2014).

Uns resultats semblants es van obtenir en el laberint en “Y”, on els animals Cck:Ndufs4cKO van mostrar un patró d’exploració semblant entre els 3 braços en comparació als controls, posant novament de manifest la manca d’alteracions en la locomoció voluntària. Tot i així, es va detectar una disminució en el nombre d’entrades al llarg dels mesos, si bé va ser en paral·lel en els dos grups d’animals, suggerint una possible habituació a la repetició del test. Addicionalment, del laberint en “Y” també se’n pot extreure informació de la memòria a curt termini en base a la tendència innata dels rosegadors per explorar un braç nou tot recordant aquells ja visitats recentment (Krauter, Guest, and Sarnyai 2019b). En aquest sentit, tampoc es van detectar diferències en l’alternança espontània dels ratolins Cck:Ndufs4cKO i consegüentment en la memòria de l’espai a curt termini. Entre d’altres zones, l’hipocamp és una de les àrees neuronals amb major implicació en el processament de la memòria (McHail and Dumas 2020; C. M. Bird and Burgess 2008) i concretament s’ha descrit el paper de les CCK<sup>INT</sup> de l’hipocamp en la formació de la memòria (del Pino et al. 2017). Malgrat l’astrogliosi observada en l’hipocamp dels ratolins Cck:Ndufs4cKO, els resultats obtinguts en el laberint en “Y” suggereixen que les funcions d’aquesta àrea neuroanatòmica no s’han vist alterades a causa de la disfunció mitocondrial.

La presència de lesions ubicades en el còrtex prefrontal va motivar l’anàlisi de la conducta de socialització en els ratolins Cck:Ndufs4cKO mitjançant el test de les 3 cambres, ja que aquesta àrea cerebral hi està àmpliament relacionada (Bicks et al. 2015; T. B. Franklin et al. 2017). En concret, s’ha descrit que alteracions en l’equilibri excitació/inhibició del còrtex, i especialment del còrtex prefrontal, estan relacionades amb dèficits socials (Yizhar et al. 2011; Bicks et al. 2015). Els ratolins Cck:Ndufs4cKO van mostrar una exploració general menor, la qual s’atribueix a un menor interès per interaccionar ja que es poden descartar els dèficits motors tal com s’evidencia en el test de l’espai obert i el laberint en “Y”. Així mateix, es va registrar una reducció en la socialització a partir dels 9 mesos d’edat. Aquests resultats

suggereixen que la deficiència del gen *Ndufs4* en les neurones CCK provoca un dèficit social que es pot relacionar amb alteracions en el còrtex prefrontal.

Altrament, els ratolins en ser suspesos en l'aire per la cua tenen tendència a estendre les extremitats com a anticipació del contacte amb una superfície. Pel contrari, diferents animals model amb lesions en diverses àrees cerebrals provoquen la flexió de les extremitats cap a l'abdomen o *claspings* (Lalonde and Strazielle 2011). A partir dels 7 mesos d'edat, els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* manifestaven el fenotip de *claspings*, amb una freqüència del 50% d'individus als 9 mesos i fins al 90% als 12 mesos. Aquesta flexió anòmala de les extremitats és un indicador de disfunció neurològica causada per afectacions en les àrees neuronals del tronc de l'encèfal, cerebel, medul·la espinal o còrtex (Lalonde and Strazielle 2011; Kandasamy et al. 2021; McManamny 2002; E. Takahashi, Niimi, and Itakura 2009). En concret, l'acumulació de plaques  $\beta$ -amiloides en el còrtex i l'hipocamp de ratolins model per la malaltia d'Alzheimer promou l'aparició de *claspings* (Lalonde et al. 2003; 2005). D'acord amb els resultats obtinguts en l'estudi histològic i per RM dels ratolins *Cck:Ndufs4cKO*, hipotetitzem que les lesions presents en el còrtex parietal derivades de la disfunció mitocondrial són les principals causants del fenotip de *claspings* en aquests animals, amb possibles alteracions en les projeccions còrtex-tàlem reticular-cerebel i còrtex-estriat-tàlem reticular. Per tal de corroborar aquesta hipòtesi proposem la reexpressió selectiva del gen *Ndufs4* en les neurones CCK del còrtex parietal a través de vectors virals en ratolins *Cck:Ndufs4cKO* adults. Aquests experiments ens permetrien confirmar la implicació del còrtex parietal en el desenvolupament del fenotip motor i de *claspings* detectats.

L'extensió de les lesions corticals tant en el còrtex motor com somatosensorial van promoure l'estudi de l'estimulació sensorial en els ratolins *Cck:Ndufs4cKO*. La nocicepció és el processament neuronal d'un estímul potencialment nociu (St. John Smith 2018), el qual pot ser detectat pels mecanoreceptors perifèrics, es transmet a la medul·la espinal i per últim és processat pel SNC (Woller et al. 2012). A nivell

cortical, diferents àrees estan relacionades amb la modulació de la nocicepció, com per exemple el còrtex motor i el somatosensorial, a través de projeccions directes amb la medulla espinal (projeccions cortico-espinals o vies descendents), per mitjà del tronc de l'encèfal o bé amb el còrtex contra-lateral (projeccions cortico-corticals; cortico-talàmiques o vies ascendents) (Gamal-Eltrabily et al. 2021; E. Diaz and Morales 2016). En humans, l'estimulació tant del còrtex motor com el còrtex somatosensorial primari indueixen analgèsia, és a dir, redueixen la percepció del dolor (Antal et al. 2008; Kirimoto et al. 2014). En base a la possible mort neuronal en les àrees corticals lesionades, esperaríem una sensibilitat alterada front als estímuls (hiperalgesia/hipoalgesia) en els ratolins Cck:Ndufs4cKO. No obstant, no es van detectar modificacions en la sensibilitat mecànica amb el test de Von Frey, així com tampoc en la conducció nerviosa central i perifèrica (motora i sensorial). Per contra, es va produir una disminució en la latència i amplitud d'alguns dels paràmetres de la conducció nerviosa als 14 mesos amb independència del genotip, corroborant les correlacions observades en humans d'edat avançada amb una disminució de l'amplitud en els components motors i sensorials (Rivner, Swift, and Malik 2001; Palve and Palve 2018).

Per últim, s'han descrit greus conseqüències en l'exposició als anestèsics en pacients amb SL (Casta et al. 1997; Grattan-Smith et al. 1990), mostrant una hipersensibilitat a l'anestèsic volàtil sevoflurà concretament en aquells pacients amb afectacions en el CI mitocondrial (Morgan, Hoppel, and Sedensky 2002). Uns resultats similars es van obtenir al mutar diferents subunitats del CI en el nematode *C. elegans*, mentre que mutacions en els complexos II, III i IV no van causar canvis en la sensibilitat als anestèsics en aquest model animal (Kayser, Morgan, and Sedensky 1999; Morgan, Kayser, and Sedensky 2007; Falk et al. 2006). A més a més, el ratolí Ndufs4KO també va ser caracteritzat amb una hipersensibilitat als anestèsics volàtils (isoflurà i halotà) a la vegada que a l'anestèsic no volàtil propofol (Quintana, Morgan, et al. 2012). Actualment encara es desconeixen els mecanismes moleculars d'acció dels anestèsics en les funcions neuronals, per bé que es considera que aquests actuen

particularment en els mitocondris i de manera general inhibint les transmissions excitatòries alhora que promovent les inhibidores (Maclver 2014; Campagna et al. 2003). En aquest sentit, la deficiència del gen *Ndufs4* específicament en neurones glutamatèrgiques va recapitular el fenotip d'hipersensibilitat als anestèsics volàtils del ratolí *Ndufs4*KO, efecte que no es va observar en la disfunció específica en neurones GABAèrgiques o colinèrgiques (Zimin et al. 2016). A més a més, la depleció amb especificitat regional del gen *Ndufs4* en ratolins adults va indicar les àrees cerebrals del còrtex associatiu parietal (PAC) i del tàlem medial central (CMT) i dorsal (DMT) amb una major sensibilitat als anestèsics, alhora que suggerint l'existència d'un circuit talamo-cortical com a responsable de la sensibilitat al isoflurà (Ramadasan-Nair et al. 2017). Totes aquestes dades apunten a que l'acció dels anestèsics volàtils és a través del CI mitocondrial amb preferència per les neurones glutamatèrgiques ubicades principalment en el PAC, CMT i DMT, àrees amb presència de neurones CCK (Whissell et al. 2015; Burgunder and Young 1988). Aquests antecedents juntament amb la no recuperació dels ratolins *Cck:Ndufs4*KO sotmesos a una anestèsia prolongada ens fan hipotetitzar una possible sensibilitat a l'anestèsic volàtil isoflurà causada per la disfunció mitocondrial específicament en neurones CCK. Les dades mostren que als 3 mesos es produeix una recuperació total dels efectes de l'anestèsia en els ratolins *Cck:Ndufs4*KO, en canvi a partir dels 6 mesos es registren les primeres morts d'animals, coincidint amb l'aparició de les lesions corticals. Per tal de corroborar aquesta hipòtesi s'hauria d'analitzar la sensibilitat a diferents anestèsics tant volàtils com no volàtils en els animals *Cck:Ndufs4*KO i controls a diferents punts temporals. En aquest cas, considerem que una exposició més breu als anestèsics evitaria les conseqüències fatals derivades d'una exposició prolongada.

## 11. La deficiència del gen *Ndufs4* en neurones PVALB provoca alteracions en el cerebel

Tot i la gran abundància de PVALB<sup>INT</sup> al còrtex, la deficiència del gen *Ndufs4* específicament en aquest subtipus d'interneurones no va desencadenar neuroinflamació aparent en cap àrea cortical dels ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO*. Per contra, en una altra estructura neuroanatòmica amb alta expressió de *Pvalb*, com és el cerebel (M. R. Celio and Heizmann 1981), es va observar neuroinflamació en els nuclis del cerebel (NCE) alhora que en el 9è i 10è lòbuls. En base a aquests resultats, sembla ser que la disfunció mitocondrial en les neurones PVALB genera major vulnerabilitat energètica en el cerebel en comparació amb el còrtex.

En el context de les malalties mitocondrials és habitual la detecció d'anomalies en el cerebel en l'anàlisi per RM, tals com senyals d'hiperintensitat en el còrtex del cerebel i en la substància blanca (Baertling et al. 2016; Scaglia et al. 2005). En concret, un 45% dels pacients amb deficiències del CI (13/29) mostren alteracions en les neuroimatges del cerebel (Lebre et al. 2011).

S'ha descrit que els nivells d'expressió de la proteïna d'unió al calci PVALB són majors en el cerebel en comparació al còrtex (Janickova et al. 2020; Endo et al. 1986). Hipotèticament no esperariem un patró diferencial d'inactivació del gen *Ndufs4* depenent dels nivells d'activació del promotor del gen *Pvalb*, ja que una baixa expressió de la recombinasa Cre és suficient per eliminar la seqüència gènica ubicada entre els constructes loxP (H. Kim et al. 2018). Malgrat tot, alts nivells d'expressió de *Pvalb* en el cerebel podrien posar en relleu la dependència que té aquesta àrea cerebral en les neurones PVALB i per tant una major susceptibilitat davant la deficiència mitocondrial.

En l'estudi del cerebel, tradicionalment s'ha utilitzat la PVALB com a marcador genèric de cèl·lules de Purkinje (CPkj) (M. R. Celio and Heizmann 1981). No obstant, recentment s'ha demostrat que la PVALB s'expressa de manera específica en un subtipus de CPkj (60%), la majoria de les quals es localitzen en la superfície del



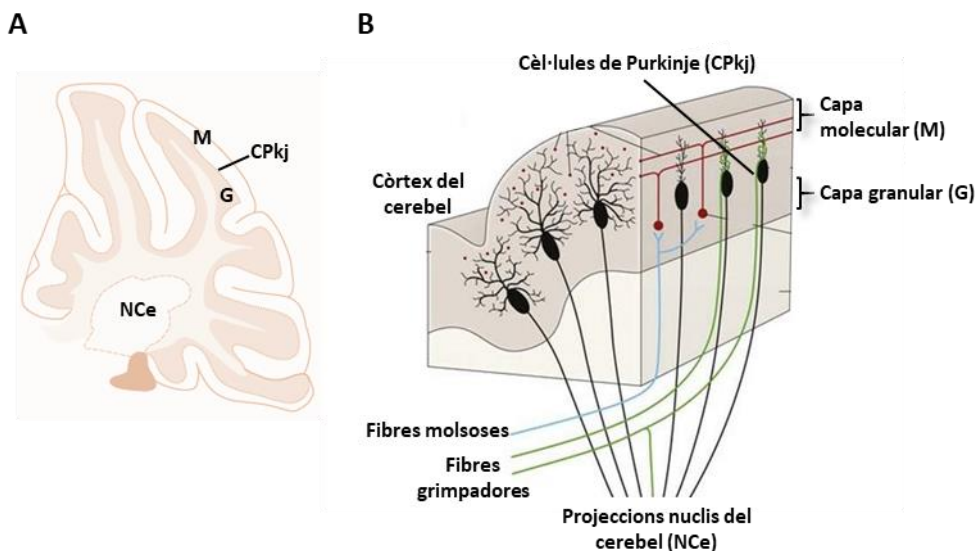
## Discussió

cerebel (Brandenburg et al. 2021). A més a més, les interneurons de la capa molecular del cerebel que innerven les CPkj també presenten marcatge per PVALB, en aquest cas de manera homogènia en totes les regions del cerebel (Brandenburg et al. 2021), així com en els NCe (Zhou et al. 2020). En aquest sentit, i tal com era d'esperar, les zones del cerebel amb marcatge positiu per PVALB - capa molecular, CPkj i NCe – es correlacionen amb les àrees amb major reactivitat astrocitària i microglial en el cervell dels ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO*, amb absència de neuroinflamació en la capa granular, la qual no mostra expressió de *Pvalb* (Figura 54).

Tot i la funció cabdal que duen a terme les CPkj en els circuits del cerebel, suggerim la hipòtesi que la neuroinflamació detectada en aquesta àrea neuroanatòmica dels ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO* no deriva exclusivament d'alteracions en les CPkj i requereix de la disfunció dels altres tipus neuronals positius per PVALB. Aquesta suposició es veu recolzada pels resultats obtinguts en inactivar específicament el gen *Ndufs4* en les CPkj utilitzant el promotor *Pcp2* (proteïna cèl·lules de Purkinje 2). Els ratolins generats no manifestaven alteracions en el comportament així com cap patologia en un anàlisi fins als 8 mesos d'edat (Quintana et al. 2010).

Altrament, podríem considerar la disfunció mitocondrial en els NCe com a principal causa del fenotip presentat pels ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO*. Aquesta àrea del cerebel actua com a integradora de les senyals excitatòries rebudes per les fibres molsoses (*mossy fibers*) i fibres grimpadores (*climbing fibers*) amb les senyals inhibidores procedents de les CPkj, per tal de generar la resposta de sortida del cerebel (Zeeuw and Berrebi 1996; van der Want, Gerrits, and Voogd 1987; Uusisaari and De Schutter 2011). Per la seva banda, els NCe projecten a diferents àrees cerebrals incloent tàlem, nucli roig i formació reticular alhora que tronc de l'encèfal a través de neurones excitatòries i als nuclis olivars amb projeccions GABAèrgiques inhibidores (Canto, Witter, and De Zeeuw 2016; Keschull et al. 2020; N. Zheng and Raman 2010). Per tant, en base a la funció integradora de les senyals dels NCe, la seva

possible disfunció alteraria en gran mesura les funcions i connexions derivades del cerebel.



**Figura 54. Anatomia del cerebel de ratolí amb la capa molecular (M), les cèl·lules de Purkinje (CPkj), la capa granular (G) i els nuclis del cerebel (NCe) com a zona integradora de les senyals cerebelars i amb projeccions a la resta del cervell. A) Tall sagital del cerebel de ratolí corresponent a la coordenada Lateral 1.08 mm. B) Secció del còrtex del cerebel indicant les diferents capes, tipus cel·lulars principals juntament amb les projeccions aferents (fibres molsoses i grimpadores) i les projeccions eferents (NCe). Adaptat de Crossman 2012.**

## 12. El cerebel contribueix en gran part a les alteracions conductuals detectades en els ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO*

La deficiència del gen *Ndufs4* en neurones PVALB va desencadenar problemes motors severos i alteracions en la conducta de socialització i d'excavació dels ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO* a partir dels 4-5 mesos d'edat. Addicionalment, no es van registrar alteracions en la supervivència ni canvis en el pes corporal dels ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO* en femelles i mascles, per bé que s'intuïa una tendència de pèrdua de pes al voltant dels 7-8 mesos d'edat, però la variabilitat de les mostres va dificultar que la tendència fos significativa.

## Discussió

El test de la barra giratòria o *rotarod* va permetre determinar que els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO presentaven alteracions en la coordinació motora i l'equilibri a partir dels 5 mesos d'edat. Aquests resultats es van corroborar amb les alteracions presentades en descendir per un llistó vertical i en creuar per un llistó horitzontal. Curiosament, la manca de coordinació en el primer test del llistó es va manifestar a partir dels 6 mesos mentre que en el segon test ja era evident als 4 mesos. En conjunt, els dèficits motors que exhibien els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO es poden relacionar amb alteracions del cerebel derivades de la disfunció mitocondrial. Diferents animals model amb atròfia del cerebel i pèrdua de CPkj mostren una coordinació motora i equilibri alterats, detectades a través del test del rotarod, desplaçament en una reixa o creuar un llistó en horitzontal (Vogel et al. 2007; Lalonde, Bensoula, and Filali 1995; Le Marec and Lalonde 1997). El cerebel és una estructura neuronal relacionada amb el control de diferents aspectes motors, com són el moviment de les extremitats, l'equilibri, l'aprenentatge motor o el control ocular, tant en humans com en ratolins (Manto et al. 2012). Aquesta àrea cerebral exerceix el control d'aquestes funcions projectant en el còrtex motor a través del tàlem i la medul·la espinal per mitjà del tronc de l'encèfal (Bohne et al. 2019; Strick, Dum, and Fiez 2009; D'Angelo 2018). Tot i així, per tal de descartar possibles alteracions musculars en els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO que emmascararien dèficits de coordinació, mancaria realitzar un estudi de la força de subjecció (*grip strength*) (Brooks and Dunnett 2009).

Adicionalment, les alteracions de la marxa observades en els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO a partir dels 6 mesos d'edat s'assimilen parcialment al tremolor descrit en un model animal amb alteracions específiques en les neurones excitatòries PVALB dels NCe (Zhou et al. 2020). Aquests resultats posen en relleu la implicació de les neurones PVLAB dels NCe en la coordinació de la marxa.

Contràriament, malgrat la severitat de les alteracions motores descrites en els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO, aquests no mostraven canvis en la locomoció voluntària

en un espai obert fins a l'edat dels 8 mesos, moment a partir del qual es va registrar una conducta d'hiperlocomoció en dits animals. Aquests resultats s'assimilen amb els presentats en un model de ratolí amb deficiència del factor d'assemblatge mitocondrial Cox10 en neurones PVALB (ratolí PV-Cox10 CKO) (Inan et al. 2016), els quals no mostraven canvis en l'activitat motora en un espai obert. No obstant, l'estudi electrofisiològic de les PVALB<sup>INT</sup> en el còrtex S1 i l'hipocamp dels ratolins PV-Cox10 CKO va posar de manifest alteracions en l'excitabilitat de les interneurons així com canvis en les oscil·lacions gamma i theta dels circuits neuronals. Per tant, en el cas dels ratolins Pvalb:Ndufs4cKO l'absència d'alteracions en la locomoció en una primera etapa no descartaria afectacions dels circuits neuronals corticals en els que estan implicades les PVALB<sup>INT</sup>. Tanmateix, una alteració de les funcions de les PVALB<sup>INT</sup> de manera crònica podria agreujar les oscil·lacions del sistema perdent completament les característiques inhibidores de les PVALB<sup>INT</sup> a llarg termini i augmentant l'excitabilitat general del còrtex. Aquest escenari es correlacionaria amb la conducta d'hiperlocomoció registrada en l'última etapa dels ratolins Pvalb:Ndufs4cKO. A més a més, un estudi recent descriu la implicació de neurones PVALB corticals amb projeccions llargues a l'estriat sobre el control de la locomoció (Melzer et al. 2017), recolzant la hipòtesi que la pèrdua de funció de les neurones PVALB podria desencadenar hiperactivitat.

Un altre comportament que pot estar associat amb alteracions motores és l'excavació. Els rosegadors tenen tendència a excavar caus per tal d'amagar-se dels depredadors, guardar-hi menjar, crear nius o bé protegir-se del fred, el qual pot ser considerat un comportament d'exploració i/o relacionat amb una conducta repetitiva/compulsiva (Pond et al. 2021). En aquest sentit, els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO van exhibir alteracions en el comportament d'excavació als 7 mesos d'edat. Paral·lelament, el test d'enterrar objectes està àmpliament relacionat amb la conducta d'excavació, test en el qual els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO també van mostrar una reducció en el nombre d'objectes enterrats. En aquest cas, hi ha estudis que descarten el component d'ansietat o de novetat enfront dels objectes,

relacionant-ho preferentment com a reflex d'una excavació repetitiva (Thomas et al. 2009). Així doncs, els dèficits motors i d'excavació presentats pels animals Pvalb:Ndufs4cKO, es corroboren amb les alteracions en l'enterrament d'objectes. Actualment es desconeixen les àrees cerebrals implicades en l'acció d'excavar en els ratolins, per bé que hi ha estudis que apunten que pot estar controlat per l'hipocamp (Deacon and Rawlins 2005) o bé per un subgrup de neurones dopaminèrgiques de l'estriat (Puighermanal et al. 2020). En qualsevol cas, en base al comportament alterat d'excavació registrat en els animals Pvalb:Ndufs4cKO sembla ser que el cerebel també pot participar en el control d'aquesta acció, possiblement a través de les connexions amb l'estriat (Bostan and Strick 2010; Hoshi et al. 2005).

En un altre ordre de caracterització fenotípica, una disminució en els nivells de proteïna PVALB està àmpliament relacionada amb el desenvolupament del trastorn de l'espectre autista, manifestant interaccions socials alterades, dèficits de comunicació i comportaments repetitius i estereotipats en animals model de la malaltia (Filice et al. 2020; Wöhr et al. 2015). Tot i mancar la pertinent comprovació quantitativa, en el cas dels ratolins Pvalb:Ndufs4cKO no pronostiquem una disminució cel·lular en els nivells de PVALB, però sí una possible pèrdua de neurones PVALB degut a la disfunció mitocondrial. Per tant, aquestes evidències van motivar l'estudi de la interacció social en els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO. En aquest sentit, en el test de les 3 cambres es va registrar una disminució de l'exploració total així com una reducció en la sociabilitat dels animals Pvalb:Ndufs4cKO, agreujada als 9 mesos d'edat. En primer lloc, es podria atribuir la disminució de l'exploració total als dèficits motors presentats a partir dels 5 mesos d'edat en els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO, hipòtesi descartada pel registre d'una locomoció sense canvis en el test de l'espai obert. En segon lloc, els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO podrien mostrar una falta d'interès en l'exploració independentment del component social, supòsit també invalidat pel fet que els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO interaccionaven i mostraven interès per l'exploració d'un objecte nou. Consegüentment, la conducta presentada pels ratolins

Pvalb:Ndufs4cKO en el test de les 3 cambres recau principalment en una reducció de la socialització. Paral·lelament, un fenotip semblant amb alteració en la socialització va ser descrit en els ratolins amb deficiència del factor d'assemblatge mitocondrial Cox10 en neurones PVALB mencionat anteriorment (Inan et al. 2016). Tant en humans com en ratolins s'ha descrit una correlació entre la disfunció del cerebel i alteracions en la cognició social (Sokolov 2018; Y. Kim et al. 2010; Tsai et al. 2012), juntament amb un desequilibri en l'excitació/inhibició del còrtex prefrontal (T. B. Franklin et al. 2017; Yizhar et al. 2011).

Una altra aspecte en el comportament i comunicació social és l'estudi de la conducta agressiva, en la qual participa el còrtex prefrontal (A. Takahashi et al. 2014) i és analitzada amb la intrusió d'un animal desconegut en la gàbia de l'animal d'estudi (Koolhaas et al. 2013). En aquest cas, els ratolins Pvalb:Ndufs4cKO mascles no van mostrar un comportament d'agressivitat en comparació als controls. Possiblement, en base al dèficit en la socialització detectada en el test dels 3 compartiments, seria més plausible esperar una reducció en l'agressivitat dels ratolins Pvalb:Ndufs4cKO, hipòtesi inviable de demostrar amb el protocol d'agressivitat en aquí efectuat. Per tal d'adreçar aquesta suposició seria més adient realitzar un aïllament social dels ratolins d'estudi previ al test més enllà de 2 setmanes per tal d'incrementar els nivells de lluita i atacs (Matsumoto et al. 2005).

### **13. La disfunció mitocondrial en neurones CCK i PVALB amb posterioritat a la formació del còrtex i del cerebel dona lloc a un fenotip tardà**

La disfunció mitocondrial constitutiva dels ratolins Ndufs4KO o de manera específica en el SNC en els ratolins NesKO, els provoca un fenotip motor molt sever juntament amb un patró neuroinflamatori característic que dona lloc a una mort prematura a P50 (Quintana et al. 2010; Quintana, Zanella, et al. 2012; Kruse et al. 2008). Per contra, en aquesta tesi s'ha descrit que la deficiència de la subunitat NDUFS4 de manera específica en neurones CCK o PVALB en ratolins origina un fenotip motor i

## Discussió

neurològic amb una progressió més dilatada en el temps, sense afectar pràcticament a la supervivència al llarg d'un any. En termes generals, el fenotip motor i cognitiu dels ratolins *Cck:Ndufs4cKO* es manifesta als 7-8 mesos d'edat, mentre que en els ratolins *Pvalb:Ndufs4cKO* es detecta a partir dels 4-5 mesos.

En els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* i *Pvalb:Ndufs4cKO*, l'aparició del fenotip a llarg termini podria estar relacionat amb el moment en que el neuropèptid *Cck* i la proteïna d'unió al calci *Pvalb* s'expressen durant el desenvolupament embrionari cortical. En aquest sentit, el gen *Cck* inicia la seva expressió en el còrtex de ratolins a dia embrionari 17,5 (E17,5) (Giacobini and Wray 2008), mentre que no es detecta la presència de *Pvalb* en el còrtex fins a dia P10 (del Rio et al. 1994) i en el cerebel fins a P15 (Endo, Kobayashi, and Onaya 1985). En tots dos casos, l'expressió de *Cck* i *Pvalb* té lloc amb posterioritat a la corticogènesis, per la qual s'estableix l'organització cortical en les diferents capes cel·lulars entre E10,5-18,5 (Götz and Huttner 2005; Marín and Rubenstein 2003). Tot això implica que possiblement la formació del còrtex i del cerebel en els ratolins *Cck:Ndufs4cKO* i *Pvalb:Ndufs4cKO* es du a terme amb aparent normalitat ja que encara no ha tingut lloc la deleció de l'exó en el gen *Ndufs4* en les neurones CCK o PVALB.

La importància del gen *Ndufs4* durant el desenvolupament neuronal es posa de manifest quan la seva deleció es produeix en la majoria de cèl·lules d'un ratolí adult induïda per tamoxifèn a P60 (ratolí *Ubc-CreERT2*), el qual no presenta un fenotip fins als 7 mesos d'edat amb problemes de coordinació i gliosis moderada (Quintana et al. 2010).

# Conclusions

---





Based on the results obtained in this doctoral thesis, we can conclude that:

1. Mitochondrial dysfunction in CCK neurons leads to parietal cortex affectation, including motor and somatosensory cortex.
2. Mitochondrial dysfunction in CCK neurons results in cortical alterations both at the anatomical level, with a reduction of cortical thickness, and at the histological level, with neuroinflammation and the formation of a glial scar.
3. Transcriptional profiling of parietal cortex in *Ndufs4*-deficient CCK neurons suggests that oxidative stress may trigger the observed cortical alterations and neuroinflammatory response.
4. Polysome-associated transcriptional profiling of CCK neurons in the parietal cortex suggests a differential synaptic organization compared to CCK neurons in the temporal cortex, which may underlie the vulnerability to mitochondrial dysfunction exhibited by these neurons in the parietal cortex.
5. Motor coordination impairment and social deficits present in *Cck:Ndufs4cKO* mice correlate with alterations in the motor cortex, the prefrontal cortex, and the loss of cortical projections.
6. *Ndufs4* deficiency in PVALB neurons causes neuroinflammation in the cerebellum, mainly in cerebellar nuclei, while cerebral cortex is mostly spared.
7. Mitochondrial dysfunction in PVALB neurons leads to motor discoordination, digging pattern alterations and social deficits, which may be related to the pathology present in the cerebellar nuclei considering their role in the integration and as an output of cerebellar information.

## Conclusions

8. Finally, we have demonstrated the role of the cerebral cortex in mitochondrial disease progression based on a new mouse model with *Ndufs4*-deficient CCK neurons. Additionally, we have corroborated the implication of the cerebellum in mitochondrial diseases due to mitochondrial dysfunction in PVALB neurons.

# Referències

---



- Abate, Marianna, Agostino Festa, Michela Falco, Angela Lombardi, Amalia Luce, Anna Grimaldi, Silvia Zappavigna, et al. 2020. "Mitochondria as Playmakers of Apoptosis, Autophagy and Senescence." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 98 (March 2019): 139–53. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.05.022>.
- Adams, Katrina L., and Vittorio Gallo. 2018. "The Diversity and Disparity of the Glial Scar." *Nature Neuroscience* 21 (1): 9–15. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0033-9>.
- Ademowo, O. S., H. K. I. Dias, D. G. A. Burton, and H. R. Griffiths. 2017. "Lipid (per) Oxidation in Mitochondria: An Emerging Target in the Ageing Process?" *Biogerontology* 18 (6): 859–79. <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9710-z>.
- Adesnik, Hillel, and Alexander Naka. 2018. "Cracking the Function of Layers in the Sensory Cortex." *Neuron* 100 (5): 1028–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.032>.
- Agirman, Gulistan, Loïc Broix, and Laurent Nguyen. 2017. "Cerebral Cortex Development: An Outside-in Perspective." *FEBS Letters* 591 (24): 3978–92. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12924>.
- Agostino, Alessandro. 2003. "Constitutive Knockout of Surf1 Is Associated with High Embryonic Lethality, Mitochondrial Disease and Cytochrome c Oxidase Deficiency in Mice." *Human Molecular Genetics* 12 (4): 399–413. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg038>.
- Ajami, Bahareh, Jami L. Bennett, Charles Krieger, Wolfram Tetzlaff, and Fabio M V Rossi. 2007. "Local Self-Renewal Can Sustain CNS Microglia Maintenance and Function throughout Adult Life." *Nature Neuroscience* 10 (12): 1538–43. <https://doi.org/10.1038/nn2014>.
- Alston, Charlotte L., Mariana C. Rocha, Nichola Z. Lax, Doug M. Turnbull, and Robert W. Taylor. 2017. "The Genetics and Pathology of Mitochondrial Disease." *The Journal of Pathology* 241 (2): 236–50. <https://doi.org/10.1002/path.4809>.
- Anderson, Stewart A, Oscar Marín, Carrie Horn, Kelly Jennings, and J L Rubenstein. 2001. "Distinct Cortical Migrations from the Medial and Lateral Ganglionic Eminences." *Development (Cambridge, England)* 128 (3): 353–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152634>.
- Angelova, Plamena R., and Andrey Y. Abramov. 2018. "Role of Mitochondrial ROS in the Brain: From Physiology to Neurodegeneration." *FEBS Letters* 592 (5): 692–702. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12964>.
- Angoa-Pérez, Mariana, Michael J. Kane, Denise I. Briggs, Dina M. Francescutti, and Donald M. Kuhn. 2013. "Marble Burying and Nestlet Shredding as Tests of Repetitive, Compulsive-like Behaviors in Mice." *Journal of Visualized Experiments*, no. 82 (December): 50978. <https://doi.org/10.3791/50978>.
- Antal, Andrea, Nadine Brepohl, Csaba Poreisz, Klara Boros, Gabor Csifcsak, and Walter Paulus. 2008. "Transcranial Direct Current Stimulation Over Somatosensory Cortex Decreases Experimentally Induced Acute Pain Perception." *The Clinical Journal of Pain* 24 (1): 56–63. <https://doi.org/10.1097/AJP.0b013e318157233b>.
- Archer, Stephen L. 2013. "Mitochondrial Dynamics — Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases." Edited by Dan L. Longo. *New England Journal of Medicine* 369 (23): 2236–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1215233>.
- Arlotta, Paola, Bradley J. Molyneaux, Jinhui Chen, Jun Inoue, Ryo Kominami, and Jeffrey D. Macklis. 2005. "Neuronal Subtype-Specific Genes That Control Corticospinal Motor Neuron Development In Vivo." *Neuron* 45 (2): 207–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.036>.
- Armstrong, Caren, and Ivan Soltesz. 2012. "Basket Cell Dichotomy in Microcircuit Function."

## Referències

- The Journal of Physiology* 590 (4): 683–94.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.223669>.
- Attwell, David, and Simon B. Laughlin. 2001. "An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 21 (10): 1133–45.  
<https://doi.org/10.1097/00004647-200110000-00001>.
- Baertling, Fabian, Dirk Klee, Tobias B. Haack, Holger Prokisch, Thomas Meitinger, Ertan Mayatepek, Jörg Schaper, and Felix Distelmaier. 2016. "The Many Faces of Paediatric Mitochondrial Disease on Neuroimaging." *Child's Nervous System* 32 (11): 2077–83.  
<https://doi.org/10.1007/s00381-016-3190-3>.
- Baertling, Fabian, Richard J. Rodenburg, Jörg Schaper, Jan A. Smeitink, W. J. H. Koopman, Ertan Mayatepek, Eva Morava, and Felix Distelmaier. 2014. "A Guide to Diagnosis and Treatment of Leigh Syndrome." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 85 (3): 257–65. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-304426>.
- Bale, Tracy L., Angelo Contarino, George W. Smith, Raymond Chan, Lisa H. Gold, Paul E. Sawchenko, George F. Koob, Wylie W. Vale, and Kuo-Fen Lee. 2000. "Mice Deficient for Corticotropin-Releasing Hormone Receptor-2 Display Anxiety-like Behaviour and Are Hypersensitive to Stress." *Nature Genetics* 24 (4): 410–14.  
<https://doi.org/10.1038/74263>.
- Bartolini, Giorgia, Gabriele Ciceri, and Oscar Marín. 2013. "Integration of GABAergic Interneurons into Cortical Cell Assemblies: Lessons from Embryos and Adults." *Neuron* 79 (5): 849–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.014>.
- Bartos, Marlene, and Claudio Elgueta. 2012. "Functional Characteristics of Parvalbumin- and Cholecystokinin-Expressing Basket Cells." *The Journal of Physiology* 590 (4): 669–81.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.226175>.
- Bartos, Marlene, Imre Vida, and Peter Jonas. 2007. "Synaptic Mechanisms of Synchronized Gamma Oscillations in Inhibitory Interneuron Networks." *Nature Reviews Neuroscience* 8 (1): 45–56. <https://doi.org/10.1038/nrn2044>.
- Bayés, Àlex, Mark O. Collins, Mike D. R. Croning, Louie N. van de Lagemaat, Jyoti S. Choudhary, and Seth G. N. Grant. 2012. "Comparative Study of Human and Mouse Postsynaptic Proteomes Finds High Compositional Conservation and Abundance Differences for Key Synaptic Proteins." Edited by Anna Dunaevsky. *PLoS ONE* 7 (10): e46683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046683>.
- Beinfeld, Margery C., Dieter K. Meyer, Robert L. Eskay, Robert T. Jensen, and Michael J. Brownstein. 1981. "The Distribution of Cholecystokinin Immunoreactivity in the Central Nervous System of the Rat as Determined by Radioimmunoassay." *Brain Research* 212 (1): 51–57. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90031-7).
- Bekiesinska-Figatowska, Monika, Hanna Mierzewska, and Elżbieta Jurkiewicz. 2013. "Basal Ganglia Lesions in Children and Adults." *European Journal of Radiology* 82 (5): 837–49. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2012.12.006>.
- Belenguer, Pascale, João M. N. Duarte, Patrícia F. Schuck, and Gustavo C. Ferreira. 2019. "Mitochondria and the Brain: Bioenergetics and Beyond." *Neurotoxicity Research* 36 (2): 219–38. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00061-7>.
- Bellistri, Elisa, Juan Aguilar, Jorge R. Brotons-Mas, Guglielmo Foffani, and Liset Menendez de la Prida. 2013. "Basic Properties of Somatosensory-Evoked Responses in the Dorsal Hippocampus of the Rat." *The Journal of Physiology* 591 (10): 2667–86.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.251892>.
- Bibb, Maureen J., Richard A. Van Etten, Catharine T. Wright, Mark W. Walberg, and David A.

- Clayton. 1981. "Sequence and Gene Organization of Mouse Mitochondrial DNA." *Cell* 26 (2): 167–80. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90300-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90300-7).
- Bicks, Lucy K., Hiroyuki Koike, Schahram Akbarian, and Hirofumi Morishita. 2015. "Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man." *Frontiers in Psychology* 6 (NOV): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01805>.
- Bird, Chris M., and Neil Burgess. 2008. "The Hippocampus and Memory: Insights from Spatial Processing." *Nature Reviews Neuroscience* 9 (3): 182–94. <https://doi.org/10.1038/nrn2335>.
- Bird, Matthew J., Xiaonan W. Wijeyeratne, Jasper C. Komen, Adrienne Laskowski, Michael T. Ryan, David R. Thorburn, and Ann E. Frazier. 2014. "Neuronal and Astrocyte Dysfunction Diverges from Embryonic Fibroblasts in the Ndufs4fky/Fky Mouse." *Bioscience Reports* 34 (6): 701–15. <https://doi.org/10.1042/BSR20140151>.
- Bissonette, Gregory B., Mihyun H. Bae, Tejas Suresh, David E. Jaffe, and Elizabeth M. Powell. 2014. "Prefrontal Cognitive Deficits in Mice with Altered Cerebral Cortical GABAergic Interneurons." *Behavioural Brain Research* 259 (1): 143–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.051>.
- Blázquez, Gloria, Anna Castañé, Ana Saavedra, Mercè Masana, Jordi Alberch, and Esther Pérez-Navarro. 2019. "Social Memory and Social Patterns Alterations in the Absence of STriatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12 (January): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00317>.
- Bodakuntla, Satish, Hana Nedožralova, Nirakar Basnet, and Naoko Mizuno. 2021. "Cytoskeleton and Membrane Organization at Axon Branches." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (September). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.707486>.
- "Body Weight Information for C57BL/6J." n.d. Accessed September 9, 2021. <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664>.
- Bohne, Pauline, Martin K. Schwarz, Stefan Herlitze, and Melanie D. Mark. 2019. "A New Projection From the Deep Cerebellar Nuclei to the Hippocampus via the Ventrolateral and Laterodorsal Thalamus in Mice." *Frontiers in Neural Circuits* 13 (August): 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00051>.
- Bohr, Vilhelm A. 2002. "Repair of Oxidative DNA Damage in Nuclear and Mitochondrial DNA, and Some Changes with Aging in Mammalian Cells." 1,2 Guest Editor: Miral Dizdaroglu 2 This Article Is Part of a Series of Reviews on 'Oxidative DNA Damage and Repair.' The Full List of Papers M." *Free Radical Biology and Medicine* 32 (9): 804–12. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00787-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00787-6).
- Bolea, Irene, Alejandro Gella, Elisenda Sanz, Patricia Prada-Dacasa, Fabien Menardy, Angela M. Bard, Pablo Machuca-Márquez, et al. 2019. "Defined Neuronal Populations Drive Fatal Phenotype in a Mouse Model of Leigh Syndrome." *ELife* 8 (August): 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.47163>.
- Borah, Supriya, Dileep Vasudevan, and Rajeeb Swain. 2019. "C-type Lectin Family XIV Members and Angiogenesis: A Review." *Oncology Letters*, August, 3954–62. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10760>.
- Bostan, Andreea C., and Peter L. Strick. 2010. "The Cerebellum and Basal Ganglia Are Interconnected." *Neuropsychology Review* 20 (3): 261–70. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9143-9>.
- Brandenburg, Cheryl, Lindsey A. Smith, Michaela B.C. Kilander, Morgan S. Bridi, Yu-Chih Lin, Shiyong Huang, and Gene J. Blatt. 2021. "Parvalbumin Subtypes of Cerebellar Purkinje Cells Contribute to Differential Intrinsic Firing Properties." *Molecular and Cellular*



## Referències

- Neuroscience* 115 (September): 103650. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2021.103650>.
- Brett-Green, Barbara, Marcy Paulsen, Richard J. Staba, Eva Fiková, and Daniel S. Barth. 2004. "Two Distinct Regions of Secondary Somatosensory Cortex in the Rat: Topographical Organization and Multisensory Responses." *Journal of Neurophysiology* 91 (3): 1327–36. <https://doi.org/10.1152/jn.00905.2003>.
- Bricout, M., D. Grévent, A. S. Lebre, M. Rio, I. Desguerre, P. De Lonlay, V. Valayannopoulos, et al. 2014. "Brain Imaging in Mitochondrial Respiratory Chain Deficiency: Combination of Brain MRI Features as a Useful Tool for Genotype/Phenotype Correlations." *Journal of Medical Genetics* 51 (7): 429–35. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102256>.
- Brochier, Thomas, Marie-Josée Boudreau, Michel Paré, and Allan M. Smith. 1999. "The Effects of Muscimol Inactivation of Small Regions of Motor and Somatosensory Cortex on Independent Finger Movements and Force Control in the Precision Grip." *Experimental Brain Research* 128 (1–2): 31–40. <https://doi.org/10.1007/s002210050814>.
- Brodman, Korbinian. 1909. *Vergleichende Lokalisationslehre Der Großhirnrinde : In Ihren Prinzipien Dargestellt Auf Grund Des Zellenbaues*. Leipzig: Johann Ambrosius Barth.
- Bronikowski, Anne M., Patrick A. Carter, John G. Swallow, Isabelle A. Girard, Justin S. Rhodes, and Theodore Garland. 2001. "Open-Field Behavior of House Mice Selectively Bred for High Voluntary Wheel-Running." *Behavior Genetics* 31 (3): 309–16. [https://doi.org/0001-8244/01/0500-0309\\$19.50/0](https://doi.org/0001-8244/01/0500-0309$19.50/0).
- Brooks, Simon P., and Stephen B. Dunnett. 2009. "Tests to Assess Motor Phenotype in Mice: A User's Guide." *Nature Reviews Neuroscience* 10 (7): 519–29. <https://doi.org/10.1038/nrn2652>.
- Brown, Garry. 2014. "Defects of Thiamine Transport and Metabolism." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 37 (4): 577–85. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9712-9>.
- Brunet, Manon, Claire Vargas, Dorian Larrieu, Jérôme Torrisani, and Marlène Dufresne. 2020. "E3 Ubiquitin Ligase TRIP12: Regulation, Structure, and Physiopathological Functions." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22): 8515. <https://doi.org/10.3390/ijms21228515>.
- Burgunder, Jean-Marc, and W. Scott Young. 1988. "The Distribution of Thalamic Projection Neurons Containing Cholecystinin Messenger RNA, Using in Situ Hybridization Histochemistry and Retrograde Labeling." *Molecular Brain Research* 4 (3): 179–89. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(88\)90024-1](https://doi.org/10.1016/0169-328X(88)90024-1).
- Calvaruso, Maria Antonietta, Peter Willems, M. van den Brand, Federica Valsecchi, Shane Kruse, Richard Palmiter, Jan Smeitink, and Leo Nijtmans. 2012. "Mitochondrial Complex III Stabilizes Complex I in the Absence of NDUFS4 to Provide Partial Activity." *Human Molecular Genetics* 21 (1): 115–20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr446>.
- Calvigioni, Daniela, Zoltán Máté, János Fuzik, Fatima Girach, Ming Dong Zhang, Andrea Varro, Johannes Beiersdorf, et al. 2017. "Functional Differentiation of Cholecystinin-Containing Interneurons Destined for the Cerebral Cortex." *Cerebral Cortex* 27 (4): 2453–68. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw094>.
- Campagna, Jason A, D Ph, Keith W Miller, D Phil, Stuart A Forman, and D Ph. 2003. "Mechanisms of Actions of Inhaled Anesthetics." *New England Journal of Medicine* 349 (9): 909–10. <https://doi.org/10.1056/NEJM200308283490917>.
- Campana, Gabriele, and Roberto Rimondini. 2021. "Mechanical Nociception in Mice and Rats: Measurement with Automated von Frey Equipment." In , 195–98.

- [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0884-5\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0884-5_17).
- Canto, Cathrin B., Laurens Witter, and Chris I. De Zeeuw. 2016. "Whole-Cell Properties of Cerebellar Nuclei Neurons In Vivo." Edited by Stéphane Charpier. *PLOS ONE* 11 (11): e0165887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165887>.
- Cardanho-Ramos, Carlos, Andreia Faria-Pereira, and Vanessa Alexandra Morais. 2020. "Orchestrating Mitochondria in Neurons: Cytoskeleton as the Conductor." *Cytoskeleton* 77 (3–4): 65–75. <https://doi.org/10.1002/cm.21585>.
- Carlén, M., K. Meletis, J. H. Siegle, J. A. Cardin, K. Futai, D. Vierling-Claassen, C. Rühlmann, et al. 2012. "A Critical Role for NMDA Receptors in Parvalbumin Interneurons for Gamma Rhythm Induction and Behavior." *Molecular Psychiatry* 17 (5): 537–48. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.31>.
- Casta, Alfonso, Elizabeth J. Quackenbush, Constance S. Houck, and Mark S. Korson. 1997. "Perioperative White Matter Degeneration and Death in a Patient with a Defect in Mitochondrial Oxidative Phosphorylation." *Anesthesiology* 87 (2): 420–25. <https://doi.org/10.1097/0000542-199708000-00030>.
- Castejon, Carlos, Natali Barros-Zulaica, and Angel Nuñez. 2016. "Control of Somatosensory Cortical Processing by Thalamic Posterior Medial Nucleus: A New Role of Thalamus in Cortical Function." Edited by Miguel Maravall. *PLOS ONE* 11 (1): e0148169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148169>.
- Castro, Anthony J. 1972. "The Effects of Cortical Ablations on Digital Usage in the Rat." *Brain Research* 37 (2): 173–85. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90665-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90665-8).
- Cavanagh, J. B., and B. N. Harding. 1994. "Pathogenic Factors Underlying the Lesions in Leigh's Disease." *Brain* 117 (6): 1357–76. <https://doi.org/10.1093/brain/117.6.1357>.
- Cecchini, Sara, L. Regnicolo, G. Polonara, M. Sallei, E. Cesaroni, M.A. Tavoni, and N. Zamponi. 2007. "Leigh Syndrome: An MR Study of Three Cases." *The Neuroradiology Journal* 20 (1): 48–55. <https://doi.org/10.1177/197140090702000108>.
- Celio, M. R., and C. W. Heizmann. 1981. "Calcium-Binding Protein Parvalbumin as a Neuronal Marker." *Nature* 293 (5830): 300–302. <https://doi.org/10.1038/293300a0>.
- Celio, Marco R. 1986. "Parvalbumin in Most  $\gamma$ -Aminobutyric Acid-Containing Neurons of the Rat Cerebral Cortex." *Science* 231 (4741): 995–97. <https://doi.org/10.1126/science.3945815>.
- Cescon, Matilde, Francesca Gattazzo, Peiwen Chen, and Paolo Bonaldo. 2015. "Collagen VI at a Glance." *Journal of Cell Science* 128 (19): 3525–31. <https://doi.org/10.1242/jcs.169748>.
- Chalmers, R. M., P. J. Lamont, I. Nelson, D. W. Ellison, N. H. Thomas, A. E. Harding, and S. R. Hamman. 1997. "A Mitochondrial DNA TRNAVal Point Mutation Associated with Adult-Onset Leigh Syndrome." *Neurology* 49 (2): 589–92. <https://doi.org/10.1212/WNL.49.2.589>.
- Chen, Jerry L., David J. Margolis, Atanas Stankov, Lazar T. Sumanovski, Bernard L. Schneider, and Fritjof Helmchen. 2015. "Pathway-Specific Reorganization of Projection Neurons in Somatosensory Cortex during Learning." *Nature Neuroscience* 18 (8): 1101–8. <https://doi.org/10.1038/nn.4046>.
- Chen, L., Y. Cui, D. Jiang, C.Y. Ma, H.-F. Tse, W.-L. Hwu, and Q. Lian. 2018. "Management of Leigh Syndrome: Current Status and New Insights." *Clinical Genetics* 93 (6): 1131–40. <https://doi.org/10.1111/cge.13139>.
- Chen, Xi, Xiao Li, Yin Ting Wong, Xuejiao Zheng, Haitao Wang, Yujie Peng, Hemin Feng, et al. 2019. "Cholecystokinin Release Triggered by NMDA Receptors Produces LTP and Sound–Sound Associative Memory." *Proceedings of the National Academy of Sciences*

## Referències

- 116 (13): 6397–6406. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816833116>.
- Chen, Yanmin, and Zu-Hang Sheng. 2013. "Kinesin-1–Syntrophin Coupling Mediates Activity-Dependent Regulation of Axonal Mitochondrial Transport." *Journal of Cell Biology* 202 (2): 351–64. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302040>.
- Chen, Yaxing, Chen Qin, Jianhan Huang, Xin Tang, Chang Liu, Keru Huang, Jianguo Xu, Gang Guo, Aiping Tong, and Liangxue Zhou. 2020. "The Role of Astrocytes in Oxidative Stress of Central Nervous System: A Mixed Blessing." *Cell Proliferation* 53 (3): 1–13. <https://doi.org/10.1111/cpr.12781>.
- Cheng, Jason S, Dena B. Dubal, Daniel H. Kim, Justin Legleiter, Irene H. Cheng, Gui-Qiu Yu, Ina Tesseur, Tony Wyss-Coray, Paolo Bonaldo, and Lennart Mucke. 2009. "Collagen VI Protects Neurons against A $\beta$  Toxicity." *Nature Neuroscience* 12 (2): 119–21. <https://doi.org/10.1038/nn.2240>.
- Chung, Jin Woong, Jun-Ho Jeon, Suk-Ran Yoon, and Inpyo Choi. 2006. "Vitamin D 3 Upregulated Protein 1 (VDUP1) Is a Regulator for Redox Signaling and Stress-Mediated Diseases." *The Journal of Dermatology* 33 (10): 662–69. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2006.00156.x>.
- Cipolat, Sara, Tomasz Rudka, Dieter Hartmann, Veronica Costa, Lutgarde Serneels, Katleen Craessaerts, Kristine Metzger, et al. 2006. "Mitochondrial Rhomboid PARL Regulates Cytochrome c Release during Apoptosis via OPA1-Dependent Cristae Remodeling." *Cell* 126 (1): 163–75. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.021>.
- Civiletto, Gabriele, Tatiana Varanita, Raffaele Cerutti, Tatiana Gorletta, Serena Barbaro, Silvia Marchet, Costanza Lamperti, Carlo Viscomi, Luca Scorrano, and Massimo Zeviani. 2015. "Opa1 Overexpression Ameliorates the Phenotype of Two Mitochondrial Disease Mouse Models." *Cell Metabolism* 21 (6): 845–54. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.016>.
- Coelho, L, B MOTA, P SALES, J MARQUES, J DEOLIVEIRA, C BONJARDIM, P PEREGRINOFERREIRA, and E KROON. 2006. "Integrin Alpha 11 Is a Novel Type I Interferon Stimulated Gene." *Cytokine* 33 (6): 352–61. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2006.03.007>.
- Cogliati, Sara, Isotta Lorenzi, Giovanni Rigoni, Federico Caicci, and Maria Eugenia Soriano. 2018. "Regulation of Mitochondrial Electron Transport Chain Assembly." *Journal of Molecular Biology* 430 (24): 4849–73. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.09.016>.
- Colón-Ramos, Daniel A. 2009. "Synapse Formation in Developing Neural Circuits." *Current Topics in Developmental Biology* 87 (09): 53–79. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)01202-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)01202-2).
- Condylis, Cameron, Eric Lowet, Jianguang Ni, Karina Bistrong, Timothy Ouellette, Nathaniel Josephs, and Jerry L. Chen. 2020. "Context-Dependent Sensory Processing across Primary and Secondary Somatosensory Cortex." *Neuron* 106 (3): 515–525.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.004>.
- Conway, Edward M. 2012. "Thrombomodulin and Its Role in Inflammation." *Seminars in Immunopathology* 34 (1): 107–25. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0282-8>.
- Cooper, Jonathan A. 2008. "A Mechanism for Inside-out Lamination in the Neocortex." *Trends in Neurosciences* 31 (3): 113–19. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.12.003>.
- Corbière, Auriane, Hubert Vaudry, Philippe Chan, Marie-Laure Walet-Balieu, Thierry Lecroq, Arnaud Lefebvre, Charles Pineau, and David Vaudry. 2019. "Strategies for the Identification of Bioactive Neuropeptides in Vertebrates." *Frontiers in Neuroscience* 13 (September): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00948>.

- Costa, Rui M., Dana Cohen, and Miguel A.L. Nicolelis. 2004. "Differential Corticostriatal Plasticity during Fast and Slow Motor Skill Learning in Mice." *Current Biology* 14 (13): 1124–34. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.053>.
- Courchet, Julien, Tommy L. Lewis, Sohyon Lee, Virginie Courchet, Deng-Yuan Liou, Shinichi Aizawa, and Franck Polleux. 2013. "Terminal Axon Branching Is Regulated by the LKB1-NUAK1 Kinase Pathway via Presynaptic Mitochondrial Capture." *Cell* 153 (7): 1510–25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.021>.
- Craven, Lyndsey, Charlotte L. Alston, Robert W. Taylor, and Doug M. Turnbull. 2017. "Recent Advances in Mitochondrial Disease." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 18 (1): 257–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035426>.
- Crespo, Mayte Álvarez, Lucas C. González Matías, Manuel Gil Lozano, Soledad Fontans Paz, Marina Romaní Pérez, Eva Vigo Gago, and Federico Mallo Ferrer. 2009. "Las Hormonas Gastrointestinales En El Control de La Ingesta de Alimentos." *Endocrinología y Nutrición* 56 (6): 317–30. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(09\)71946-1](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(09)71946-1).
- Curley, Allison A., Stephen M. Eggan, Matt S. Lazarus, Z. Josh Huang, David W. Volk, and David A. Lewis. 2013. "Role of Glutamic Acid Decarboxylase 67 in Regulating Cortical Parvalbumin and GABA Membrane Transporter 1 Expression: Implications for Schizophrenia." *Neurobiology of Disease* 50 (1): 179–86. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.10.018>.
- D'Angelo, Egidio. 2018. "Physiology of the Cerebellum." In *Handbook of Clinical Neurology*, 1st ed., 154:85–108. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63956-1.00006-0>.
- Da-Rè, Caterina, Sophia von Stockum, Alberto Biscontin, Caterina Millino, Paola Cisotto, Mauro A. Zordan, Massimo Zeviani, Paolo Bernardi, Cristiano De Pittà, and Rodolfo Costa. 2014. "Leigh Syndrome in *Drosophila Melanogaster*." *Journal of Biological Chemistry* 289 (42): 29235–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.602938>.
- Danet, Guénahel H., Jennifer L. Luongo, Gary Butler, Min Min Lu, Andrea J. Tenner, M. Celeste Simon, and Dominique A. Bonnet. 2002. "C1qRp Defines a New Human Stem Cell Population with Hematopoietic and Hepatic Potential." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (16): 10441–45. <https://doi.org/10.1073/pnas.162104799>.
- Darin, Niklas, Anders Oldfors, Ali-Reza Moslemi, Elisabeth Holme, and Mr Tulinius. 2001. "The Incidence of Mitochondrial Encephalomyopathies in Childhood: Clinical Features and Morphological, Biochemical, and DNA Abnormalities." *Annals of Neurology* 49 (3): 377–83. <https://doi.org/10.1002/ana.75>.
- Davidovich, Pavel, Conor J. Kearney, and Seamus J. Martin. 2014. "Inflammatory Outcomes of Apoptosis, Necrosis and Necroptosis." *Biological Chemistry* 395 (10): 1163–71. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0164>.
- Davis, A F, and D A Clayton. 1996. "In Situ Localization of Mitochondrial DNA Replication in Intact Mammalian Cells." *Journal of Cell Biology* 135 (4): 883–93. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.4.883>.
- Deacon, Robert M.J., and J. Nicholas P. Rawlins. 2005. "Hippocampal Lesions, Species-Typical Behaviours and Anxiety in Mice." *Behavioural Brain Research* 156 (2): 241–49. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.027>.
- Deacon, Robert M J. 2006. "Digging and Marble Burying in Mice: Simple Methods for in Vivo Identification of Biological Impacts." *Nature Protocols* 1 (1): 122–24. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.20>.

## Referències

- Dell’Agnello, Carlotta, Sara Leo, Alessandro Agostino, György Szabadkai, C. Cecilia Tiveron, A. Alessandra Zulian, Alessandro Prella, Pierre Roubertoux, Rosario Rizzuto, and Massimo Zeviani. 2007. “Increased Longevity and Refractoriness to Ca<sup>2+</sup>-Dependent Neurodegeneration in Surf1 Knockout Mice.” *Human Molecular Genetics* 16 (4): 431–44. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl477>.
- Denecker, G, D Vercammen, W Declercq, and P Vandenabeele. 2001. “Cellular and Molecular Life Sciences Apoptotic and Necrotic Cell Death Induced by Death Domain Receptors.” *Microbial Pathogenesis* 58: 356–70.
- Devine, Michael J., and Josef T. Kittler. 2018. “Mitochondria at the Neuronal Presynapse in Health and Disease.” *Nature Reviews Neuroscience* 19 (2): 63–80. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.170>.
- Diaz, Eric, and Humberto Morales. 2016. “Spinal Cord Anatomy and Clinical Syndromes.” *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* 37 (5): 360–71. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2016.05.002>.
- Diaz, Francisca, Christine K. Thomas, Sofia Garcia, Dayami Hernandez, and Carlos T. Moraes. 2005. “Mice Lacking COX10 in Skeletal Muscle Recapitulate the Phenotype of Progressive Mitochondrial Myopathies Associated with Cytochrome c Oxidase Deficiency.” *Human Molecular Genetics* 14 (18): 2737–48. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi307>.
- DiMauro, Salvatore, and Eric A. Schon. 2003. “Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases.” *New England Journal of Medicine* 348 (26): 2656–68. <https://doi.org/10.1056/NEJMra022567>.
- Dingle, Aaron, Weifeng Zeng, Jared P. Ness, Nicholas Albano, Rashea L. Minor, Coner Feldman, Mark Austin, et al. 2019. “Strategies for Interfacing with the Trigeminal Nerves in Rodents for Bioelectric Medicine.” *Journal of Neuroscience Methods* 324 (March): 108321. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108321>.
- Distelmaier, Felix, Werner J.H. Koopman, L. P. van den Heuvel, Richard J. Rodenburg, Ertan Mayatepek, Peter H.G.M. Willems, and Jan A.M. Smeitink. 2008. “Mitochondrial Complex I Deficiency: From Organelle Dysfunction to Clinical Disease.” *Brain* 132 (4): 833–42. <https://doi.org/10.1093/brain/awp058>.
- Does, Mark D. 2018. “Inferring Brain Tissue Composition and Microstructure via MR Relaxometry.” *NeuroImage* 182 (October 2017): 136–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.12.087>.
- Doischer, Daniel, J. Aurel Hosp, Yuchio Yanagawa, Kunihiro Obata, Peter Jonas, Imre Vida, and Marlene Bartos. 2008. “Postnatal Differentiation of Basket Cells from Slow to Fast Signaling Devices.” *Journal of Neuroscience* 28 (48): 12956–68. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2890-08.2008>.
- Donato, Flavio, Santiago Belluco Rompani, and Pico Caroni. 2013. “Parvalbumin-Expressing Basket-Cell Network Plasticity Induced by Experience Regulates Adult Learning.” *Nature* 504 (7479): 272–76. <https://doi.org/10.1038/nature12866>.
- Drechsel, Derek A., and Manisha Patel. 2010. “Respiration-Dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Removal in Brain Mitochondria via the Thioredoxin/Peroxiredoxin System.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (36): 27850–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.101196>.
- Ecker, Christine, Susan Y. Bookheimer, and Declan G M Murphy. 2015. “Neuroimaging in Autism Spectrum Disorder: Brain Structure and Function across the Lifespan.” *The Lancet Neurology* 14 (11): 1121–34. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00050-2).
- Elmore, Susan. 2007. “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.” *Toxicologic*

- Pathology* 35 (4): 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- Endo, Toyoshi, Shigeru Kobayashi, and Toshimasa Onaya. 1985. "Parvalbumin in Rat Cerebrum, Cerebellum and Retina during Postnatal Development." *Neuroscience Letters* 60 (3): 279–82. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90590-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90590-7).
- Endo, Toyoshi, Kazunaga Takazawa, Shigeru Kobayashi, and Toshimasa Onaya. 1986. "Immunochemical and Immunohistochemical Localization of Parvalbumin in Rat Nervous Tissues." *Journal of Neurochemistry* 46 (3): 892–98. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1986.tb13055.x>.
- Erturk, A., Yuanyuan Wang, and Morgan Sheng. 2014. "Local Pruning of Dendrites and Spines by Caspase-3-Dependent and Proteasome-Limited Mechanisms." *Journal of Neuroscience* 34 (5): 1672–88. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3121-13.2014>.
- Erven, P.M.M. van, J.P.M. Cillessen, E.M.W. Eekhoff, F.J.M. Gabreëls, W.H. Doesburg, W.A.J.G. Lemmens, J.L. Slooff, W.O. Renier, and W. Ruitenbeek. 1987. "Leigh Syndrome, a Mitochondrial Encephalo(My)Pathy." *Clinical Neurology and Neurosurgery* 89 (4): 217–30. [https://doi.org/10.1016/S0303-8467\(87\)80020-3](https://doi.org/10.1016/S0303-8467(87)80020-3).
- Essen, David C. Van, Chad J. Donahue, and Matthew F. Glasser. 2018. "Development and Evolution of Cerebral and Cerebellar Cortex." *Brain, Behavior and Evolution* 91 (3): 158–69. <https://doi.org/10.1159/000489943>.
- Falk, Marni J. 2010. "Neurodevelopmental Manifestations of Mitochondrial Disease." *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics* 31 (7): 610–21. <https://doi.org/10.1097/DBP.0b013e3181ef42c1>.
- Falk, Marni J., Ernst-Bernhard Kayser, Philip G. Morgan, and Margaret M. Sedensky. 2006. "Mitochondrial Complex I Function Modulates Volatile Anesthetic Sensitivity in *C. Elegans*." *Current Biology* 16 (16): 1641–45. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.072>.
- Farré-Castany, Maria A., Beat Schwaller, Patrick Gregory, Jaroslaw Barski, Céline Mariethoz, Jan L. Eriksson, Igor V. Tetko, et al. 2007. "Differences in Locomotor Behavior Revealed in Mice Deficient for the Calcium-Binding Proteins Parvalbumin, Calbindin D-28k or Both." *Behavioural Brain Research* 178 (2): 250–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.01.002>.
- Fassone, Elisa, and Shamima Rahman. 2012. "Complex I Deficiency: Clinical Features, Biochemistry and Molecular Genetics." *Journal of Medical Genetics* 49 (9): 578–90. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101159>.
- Fernandez-Fernandez, Seila, Angeles Almeida, and Juan P. Bolaños. 2012. "Antioxidant and Bioenergetic Coupling between Neurons and Astrocytes." *Biochemical Journal* 443 (1): 3–11. <https://doi.org/10.1042/BJ20111943>.
- Filice, Federica, Lucia Janickova, Thomas Henzi, Alessandro Bilella, and Beat Schwaller. 2020. "The Parvalbumin Hypothesis of Autism Spectrum Disorder." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14 (December): 1–24. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.577525>.
- Filippi, Massimo, and Federica Agosta. 2016. "Diffusion Tensor Imaging and Functional MRI." In *Handbook of Clinical Neurology*, 1st ed., 136:1065–87. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53486-6.00056-9>.
- Filippo, Massimiliano Di, Davide Chiasserini, Alessandro Tozzi, Barbara Picconi, and Paolo Calabresi. 2010. "Mitochondria and the Link Between Neuroinflammation and Neurodegeneration." Edited by Xiongwei Zhu, M. Flint Beal, Xinglong Wang, George Perry, and Mark A. Smith. *Journal of Alzheimer's Disease* 20 (s2): S369–79. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100543>.

## Referències

- Fink, Susan L., and Brad T. Cookson. 2005. "Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells." *Infection and Immunity* 73 (4): 1907–16. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>.
- Finsterer, Josef. 2008. "Leigh and Leigh-Like Syndrome in Children and Adults." *Pediatric Neurology* 39 (4): 223–35. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2008.07.013>.
- Fogassi, Leonardo, V Gallese, G Buccino, L Craighero, L Fadiga, and G Rizzolatti. 2001. "Cortical Mechanism for the Visual Guidance of Hand Grasping Movements in the Monkey: A Reversible Inactivation Study." *Brain : A Journal of Neurology* 124 (Pt 3): 571–86. <https://doi.org/10.1093/brain/124.3.571>.
- Forman, Henry Jay, Hongqiao Zhang, and Alessandra Rinna. 2009. "Glutathione: Overview of Its Protective Roles, Measurement, and Biosynthesis." *Molecular Aspects of Medicine* 30 (1–2): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
- Fox, Bridget C., Luke Slade, Roberta Torregrossa, Dario Pacitti, Csaba Szabo, Timothy Etheridge, and Matthew Whiteman. 2021. "The Mitochondria-targeted Hydrogen Sulfide Donor AP39 Improves Health and Mitochondrial Function in a <scp> C. Elegans </Scp> Primary Mitochondrial Disease Model." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 44 (2): 367–75. <https://doi.org/10.1002/jimd.12345>.
- Franklin, Keith, and Gorge Paxinos. 2007. "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates." Compact, 3rd Edition. 2007. <https://www.elsevier.com/books/the-mouse-brain-in-stereotaxic-coordinates-compact/franklin/978-0-12-374244-5>.
- Franklin, Tamara B., Bianca A. Silva, Zinaida Perova, Livia Marrone, Maria E. Masferrer, Yang Zhan, Angie Kaplan, et al. 2017. "Prefrontal Cortical Control of a Brainstem Social Behavior Circuit." *Nature Neuroscience* 20 (2): 260–70. <https://doi.org/10.1038/nn.4470>.
- Freund, Tamás F., and István Katona. 2007. "Perisomatic Inhibition." *Neuron* 56 (1): 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.012>.
- Frezel, N, E Platonova, F F Voigt, J M Mateos, R Kastli, U Ziegler, T Karayannis, F Helmchen, H Wildner, and H U Zeilhofer. 2020. "In-Depth Characterization of Layer 5 Output Neurons of the Primary Somatosensory Cortex Innervating the Mouse Dorsal Spinal Cord." *Cerebral Cortex Communications* 1 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1093/texcom/tgaa052>.
- Friedman, Jonathan R., and Jodi Nunnari. 2014. "Mitochondrial Form and Function." *Nature* 505 (7483): 335–43. <https://doi.org/10.1038/nature12985>.
- Fuzik, János, Amit Zeisel, Zoltán Máté, Daniela Calvigioni, Yuchio Yanagawa, Gábor Szabó, Sten Linnarsson, and Tibor Harkany. 2016. "Integration of Electrophysiological Recordings with Single-Cell RNA-Seq Data Identifies Neuronal Subtypes." *Nature Biotechnology* 34 (2): 175–83. <https://doi.org/10.1038/nbt.3443>.
- Gál, Péter, József Dobó, Péter Závodszy, and Robert B.M. Sim. 2009. "Early Complement Proteases: C1r, C1s and MASPs. A Structural Insight into Activation and Functions." *Molecular Immunology* 46 (14): 2745–52. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.04.026>.
- Gallopín, Thierry, Hélène Geoffroy, Jean Rossier, and Bertrand Lambollez. 2006. "Cortical Sources of CRF, NKB, and CCK and Their Effects on Pyramidal Cells in the Neocortex." *Cerebral Cortex* 16 (10): 1440–52. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhj081>.
- Gamal-Eltrabily, Mohammed, Guadalupe Martínez-Lorenzana, Abimael González-Hernández, and Miguel Condés-Lara. 2021. "Cortical Modulation of Nociception." *Neuroscience* 458: 256–70. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.01.001>.

- Gao, Pan, Fang-Fang He, Hui Tang, Chun-Tao Lei, Shan Chen, Xian-Fang Meng, Hua Su, and Chun Zhang. 2015. "NADPH Oxidase-Induced NALP3 Inflammasome Activation Is Driven by Thioredoxin-Interacting Protein Which Contributes to Podocyte Injury in Hyperglycemia." *Journal of Diabetes Research* 2015: 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/504761>.
- Gerards, Mike, René de Coo, and Hubert Smeets. 2014. "Reply: Infantile Leigh-like Syndrome Caused by SLC19A3 Mutations Is a Treatable Disease." *Brain* 137 (9): e296–e296. <https://doi.org/10.1093/brain/awu129>.
- Gerards, Mike, Rick Kamps, Jo van Oevelen, Iris Boesten, Eveline Jongen, Bart de Koning, Hans R. Scholte, et al. 2013. "Exome Sequencing Reveals a Novel Moroccan Founder Mutation in SLC19A3 as a New Cause of Early-Childhood Fatal Leigh Syndrome." *Brain* 136 (3): 882–90. <https://doi.org/10.1093/brain/awt013>.
- Gerards, Mike, Suzanne C.E.H. Sallevelt, and Hubert J.M. Smeets. 2016. "Leigh Syndrome: Resolving the Clinical and Genetic Heterogeneity Paves the Way for Treatment Options." *Molecular Genetics and Metabolism* 117 (3): 300–312. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.12.004>.
- Gerlach, M., D. Ben-Shachar, P. Riederer, and M B Youdim. 1994. "Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative Diseases?" *Journal of Neurochemistry* 63 (3): 793–807. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63030793.x>.
- Giacobini, Paolo, and Susan Wray. 2008. "Prenatal Expression of Cholecystokinin (CCK) in the Central Nervous System (CNS) of Mouse." *Neuroscience Letters* 438 (1): 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.04.042>.
- Gorman, Gráinne S., Patrick F. Chinnery, Salvatore DiMauro, Michio Hirano, Yasutoshi Koga, Robert McFarland, Anu Suomalainen, David R. Thorburn, Massimo Zeviani, and Douglass M. Turnbull. 2016. "Mitochondrial Diseases." *Nature Reviews Disease Primers* 2 (1): 16080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>.
- Gorman, Gráinne S., Andrew M. Schaefer, Yi Ng, Nicholas Gomez, Emma L. Blakely, Charlotte L. Alston, Catherine Feeney, et al. 2015. "Prevalence of Nuclear and Mitochondrial DNA Mutations Related to Adult Mitochondrial Disease." *Annals of Neurology* 77 (5): 753–59. <https://doi.org/10.1002/ana.24362>.
- Götz, Magdalena, and Wieland B. Huttner. 2005. "The Cell Biology of Neurogenesis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (10): 777–88. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>.
- Grad, Leslie I., and Bernard D. Lemire. 2006. "Riboflavin Enhances the Assembly of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase in *C. Elegans* NADH-Ubiquinone Oxidoreductase Mutants." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757 (2): 115–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.11.009>.
- Grant, Seth G N. 2019. "Synapse Diversity and Synaptome Architecture in Human Genetic Disorders." *Human Molecular Genetics* 28 (R2): R219–25. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz178>.
- Grattan-Smith, Padraic J., Lloyd K Shield, Ian J Hopkins, and Kevin J Collins. 1990. "Acute Respiratory Failure Precipitated by General Anesthesia in Leigh's Syndrome." *Journal of Child Neurology* 5 (2): 137–41. <https://doi.org/10.1177/088307389000500214>.
- Gu, Hua, Yong-Rui Zou, and Klaus Rajewsky. 1993. "Independent Control of Immunoglobulin Switch Recombination at Individual Switch Regions Evidenced through Cre-LoxP-Mediated Gene Targeting." *Cell* 73 (6): 1155–64. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90644-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90644-6).
- Gulyás, Attila I., György Buzsáki, Tamás F. Freund, and Hajime Hirase. 2006. "Populations of Hippocampal Inhibitory Neurons Express Different Levels of Cytochrome C." *European*



## Referències

- Journal of Neuroscience* 23 (10): 2581–94. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04814.x>.
- Guo, Fei, Celia Sigua, Purva Bali, Prince George, Warren Fiskus, Anna Scuto, Srinivas Annavarapu, et al. 2005. "Mechanistic Role of Heat Shock Protein 70 in Bcr-Abl-Mediated Resistance to Apoptosis in Human Acute Leukemia Cells." *Blood* 105 (3): 1246–55. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-2041>.
- Guo, Jian-Zhong, Austin R. Graves, Wendy W. Guo, Jihong Zheng, Allen Lee, Juan Rodríguez-González, Nuo Li, et al. 2015. "Cortex Commands the Performance of Skilled Movement." *eLife* 4 (DECEMBER2015): 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.10774>.
- Guo, Runyu, Jinke Gu, Shuai Zong, Meng Wu, and Maojun Yang. 2018. "Structure and Mechanism of Mitochondrial Electron Transport Chain." *Biomedical Journal* 41 (1): 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.12.001>.
- Gupta, Amitabh, Li-Huei Tsai, and Anthony Wynshaw-Boris. 2002. "Life Is a Journey: A Genetic Look at Neocortical Development." *Nature Reviews Genetics* 3 (5): 342–55. <https://doi.org/10.1038/nrg799>.
- Guy, Julien, and Jochen F. Staiger. 2017. "The Functioning of a Cortex without Layers." *Frontiers in Neuroanatomy* 11 (July): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00054>.
- Guzmán-De-Villoria, Juan A., Pilar Fernández-García, and Concepción Ferreiro-Argüelles. 2010. "Differential Diagnosis of T2 Hyperintense Brainstem Lesions: Part 1. Focal Lesions." *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* 31 (3): 246–59. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2010.03.001>.
- Hamoir, G, and S Konosu. 1965. "CARP MYOGENS OF WHITE AND RED MUSCLES. GENERAL COMPOSITION AND ISOLATION OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT COMPONENTS OF ABNORMAL AMINO ACID COMPOSITION." *Biochemical Journal* 96 (1): 85–97. <https://doi.org/10.1042/bj0960085>.
- Harhausen, Denise, Vincent Prinz, Gina Ziegler, Karen Gertz, Matthias Endres, Hans Lehrach, Philippe Gasque, et al. 2010. "CD93/AA4.1: A Novel Regulator of Inflammation in Murine Focal Cerebral Ischemia." *The Journal of Immunology* 184 (11): 6407–17. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902342>.
- Harper, A. A., and H. S. Raper. 1943. "Pancreozymin, a Stimulant of the Secretion of Pancreatic Enzymes in Extracts of the Small Intestine." *The Journal of Physiology* 102 (1): 115–25. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1943.sp004021>.
- Harris, Kenneth D., and Gordon M G Shepherd. 2015. "The Neocortical Circuit: Themes and Variations." *Nature Neuroscience* 18 (2): 170–81. <https://doi.org/10.1038/nn.3917>.
- Hartig, Sean M., Shuhei Ishikura, Rachel S. Hicklen, Yanming Feng, Elisabeth G. Blanchard, Kevin A. Voelker, Christina S. Pichot, et al. 2009. "The F-BAR Protein CIP4 Promotes GLUT4 Endocytosis through Bidirectional Interactions with N-WASp and Dynamin-2." *Journal of Cell Science* 122 (13): 2283–91. <https://doi.org/10.1242/jcs.041343>.
- Haubensak, Wulf, Alessio Attardo, Winfried Denk, and Wieland B. Huttner. 2004. "From The Cover: Neurons Arise in the Basal Neuroepithelium of the Early Mammalian Telencephalon: A Major Site of Neurogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (9): 3196–3201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308600100>.
- Hayashi, Genki, and Gino Cortopassi. 2015. "Oxidative Stress in Inherited Mitochondrial Diseases." *Free Radical Biology and Medicine* 88 (5): 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.039>.
- Hayes, John A., Andrew Kottick, Maria Cristina D. Picardo, Andrew D. Halleran, Ronald D.

- Smith, Gregory D. Smith, Margaret S. Saha, and Christopher A. Del Negro. 2017. "Transcriptome of Neonatal PreBötzing Complex Neurons in Dbx1 Reporter Mice." *Scientific Reports* 7 (1): 8669. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09418-4>.
- He, Shuijin, Zhizhong Li, Shaoyu Ge, Yong-Chun Yu, and Song-Hai Shi. 2015. "Inside-Out Radial Migration Facilitates Lineage-Dependent Neocortical Microcircuit Assembly." *Neuron* 86 (5): 1159–66. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.002>.
- Helenius, Johanna, Lauri Soinnie, Jussi Perkiö, Oili Salonen, Aki Kangasmäki, Markku Kaste, Richard A D Carano, Hannu J. Aronen, and Turgut Tatlisumak. 2002. "Diffusion-Weighted MR Imaging in Normal Human Brains in Various Age Groups." *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 23 (2): 194–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11847041>.
- Hevner, Robert F. 2007. "Layer-Specific Markers as Probes for Neuron Type Identity in Human Neocortex and Malformations of Cortical Development." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66 (2): 101–9. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3180301c06>.
- Higo, Shigeyoshi. 2009. "Subtypes of GABAergic Neurons Project Axons in the Neocortex." *Frontiers in Neuroanatomy* 3 (NOV): 1–5. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.025.2009>.
- Hippenmeyer, Simon, Eline Vrieseling, Markus Sigrist, Thomas Portmann, Celia Laengle, David R. Ladle, and Silvia Arber. 2005. "A Developmental Switch in the Response of DRG Neurons to ETS Transcription Factor Signaling." Edited by Joshua R. Sanes. *PLoS Biology* 3 (5): e159. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030159>.
- Holmgren, Carl, Tibor Harkany, Björn Svennenfors, and Yuri Zilberter. 2003. "Pyramidal Cell Communication within Local Networks in Layer 2/3 of Rat Neocortex." *The Journal of Physiology* 551 (1): 139–53. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.044784>.
- Horváth, Rita, A. Abicht, E. Holinski-Feder, A. Laner, K. Gempel, H. Prokisch, H. Lochmüller, T. Klopstock, and M. Jaksch. 2006. "Leigh Syndrome Caused by Mutations in the Flavoprotein (Fp) Subunit of Succinate Dehydrogenase (SDHA)." *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 77 (1): 74–76. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.067041>.
- Hoshi, Eiji, Léon Tremblay, Jean Féger, Peter L. Carras, and Peter L. Strick. 2005. "The Cerebellum Communicates with the Basal Ganglia." *Nature Neuroscience* 8 (11): 1491–93. <https://doi.org/10.1038/nn1544>.
- Hu, Hua, Jian Gan, and Peter Jonas. 2014. "Fast-Spiking, Parvalbumin+ GABAergic Interneurons: From Cellular Design to Microcircuit Function." *Science* 345 (6196): 1255263–1255263. <https://doi.org/10.1126/science.1255263>.
- Hutton, Chloe, Enrico De Vita, John Ashburner, Ralf Deichmann, and Robert Turner. 2008. "Voxel-Based Cortical Thickness Measurements in MRI." *NeuroImage* 40 (4): 1701–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.01.027>.
- Ikeda, Keiko, Kiyoshi Kawakami, Hiroshi Onimaru, Yasumasa Okada, Shigefumi Yokota, Naohiro Koshiya, Yoshitaka Oku, Makito Iizuka, and Hidehiko Koizumi. 2017. "The Respiratory Control Mechanisms in the Brainstem and Spinal Cord: Integrative Views of the Neuroanatomy and Neurophysiology." *The Journal of Physiological Sciences* 67 (1): 45–62. <https://doi.org/10.1007/s12576-016-0475-y>.
- Inan, Melis, Mingrui Zhao, Monica Manuszak, Cansu Karakaya, Anjali M. Rajadhyaksha, Virginia M. Pickel, Theodore H. Schwartz, Peter A. Goldstein, and Giovanni Manfredi. 2016. "Energy Deficit in Parvalbumin Neurons Leads to Circuit Dysfunction, Impaired Sensory Gating and Social Disability." *Neurobiology of Disease* 93 (September): 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.04.004>.

## Referències

- Ishrat, Tauheed, Islam N. Mohamed, Bindu Pillai, Sahar Soliman, Abdelrahman Y. Fouda, Adviy Ergul, Azza B. El-Remessy, and Susan C. Fagan. 2015. "Thioredoxin-Interacting Protein: A Novel Target for Neuroprotection in Experimental Thromboembolic Stroke in Mice." *Molecular Neurobiology* 51 (2): 766–78. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8766-x>.
- Ito, Takashi, Midori Kakuuchi, and Ikuro Maruyama. 2021. "Endotheliopathy in Septic Conditions: Mechanistic Insight into Intravascular Coagulation." *Critical Care* 25 (1): 95. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03524-6>.
- Itoh, Toshiki, Kai S. Erdmann, Aurelien Roux, Bianca Habermann, Hauke Werner, and Pietro De Camilli. 2005. "Dynamain and the Actin Cytoskeleton Cooperatively Regulate Plasma Membrane Invagination by BAR and F-BAR Proteins." *Developmental Cell* 9 (6): 791–804. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.11.005>.
- Ivy, A. C., and Eric Oldberg. 1928. "A HORMONE MECHANISM FOR GALL-BLADDER CONTRACTION AND EVACUATION." *American Journal of Physiology-Legacy Content* 86 (3): 599–613. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1928.86.3.599>.
- Iwata, Ryohei, Pierre Casimir, and Pierre Vanderhaeghen. 2020. "Mitochondrial Dynamics in Postmitotic Cells Regulate Neurogenesis." *Science* 369 (6505): 858–62. <https://doi.org/10.1126/science.aba9760>.
- Jahng, Geon-Ho, Ka-Loh Li, Leif Ostergaard, and Fernando Calamante. 2014. "Perfusion Magnetic Resonance Imaging: A Comprehensive Update on Principles and Techniques." *Korean Journal of Radiology* 15 (5): 554. <https://doi.org/10.3348/kjr.2014.15.5.554>.
- Janickova, Lucia, Karin Farah Rechberger, Lucas Wey, and Beat Schwaller. 2020. "Absence of Parvalbumin Increases Mitochondria Volume and Branching of Dendrites in Inhibitory Pvalb Neurons in Vivo: A Point of Convergence of Autism Spectrum Disorder (ASD) Risk Gene Phenotypes." *Molecular Autism* 11 (1): 47. <https://doi.org/10.1186/s13229-020-00323-8>.
- Janssen, A.J.M., J.A.M. Smeitink, and L.P. van den Heuvel. 2003. "Some Practical Aspects of Providing a Diagnostic Service for Respiratory Chain Defects." *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* 40 (1): 3–8. <https://doi.org/10.1258/000456303321016114>.
- Jeong, Seon-Yong, and Dai-Wu Seol. 2008. "The Role of Mitochondria in Apoptosis." *BMB Reports* 41 (1): 11–22. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2008.41.1.011>.
- Ji, Bingyuan, Baohua Cheng, Yanyou Pan, Chunmei Wang, Jing Chen, and Bo Bai. 2017. "Neuroprotection of Bradykinin/Bradykinin B2 Receptor System in Cerebral Ischemia." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 94 (16): 1057–63. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.042>.
- Jiang, X., M. Lachance, and E. Rossignol. 2016. "Involvement of Cortical Fast-Spiking Parvalbumin-Positive Basket Cells in Epilepsy." In *Progress in Brain Research*, 226:81–126. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.04.012>.
- Jiang, Xiaolong, Shan Shen, Cathryn R. Cadwell, Philipp Berens, Fabian Sinz, Alexander S. Ecker, Saumil Patel, and Andreas S. Tolias. 2015. "Principles of Connectivity among Morphologically Defined Cell Types in Adult Neocortex." *Science* 350 (6264): 139–48. <https://doi.org/10.1126/science.aac9462>.
- Jinno, Shozo, and Toshio Kosaka. 2004. "Parvalbumin Is Expressed in Glutamatergic and GABAergic Corticostriatal Pathway in Mice." *The Journal of Comparative Neurology* 477 (2): 188–201. <https://doi.org/10.1002/cne.20246>.

- Jo, Areum, Sangwoo Ham, Gum Hwa Lee, Yun-Il Lee, Sangseong Kim, Yun-Song Lee, Joo-Ho Shin, and Yunjong Lee. 2015. "Efficient Mitochondrial Genome Editing by CRISPR/Cas9." *BioMed Research International* 2015: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/305716>.
- John Smith, Ewan St. 2018. "Advances in Understanding Nociception and Neuropathic Pain." *Journal of Neurology* 265 (2): 231–38. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8641-6>.
- Johnson, Simon C., Melana E. Yanos, E.-B. Kayser, Albert Quintana, Maya Sangesland, Anthony Castanza, Lauren Uhde, et al. 2013. "MTOR Inhibition Alleviates Mitochondrial Disease in a Mouse Model of Leigh Syndrome." *Science* 342 (6165): 1524–28. <https://doi.org/10.1126/science.1244360>.
- Junn, Eunsung, Seung Hyun Han, Joo Young Im, Young Yang, Eun Wie Cho, Hong Duck Um, Do Kyun Kim, et al. 2000. "Vitamin D 3 Up-Regulated Protein 1 Mediates Oxidative Stress Via Suppressing the Thioredoxin Function." *The Journal of Immunology* 164 (12): 6287–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6287>.
- Jüttner, R., and F. G. Rathjen. 2005. "Molecular Analysis of Axonal Target Specificity and Synapse Formation." *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (23): 2811–27. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5299-5>.
- Kakizuka, Akira. 1998. "Protein Precipitation: A Common Etiology in Neurodegenerative Disorders?" *Trends in Genetics* 14 (10): 396–402. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(98\)01559-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(98)01559-5).
- Kanabus, M., S. J. Heales, and S. Rahman. 2014. "Development of Pharmacological Strategies for Mitochondrial Disorders." *British Journal of Pharmacology* 171 (8): 1798–1817. <https://doi.org/10.1111/bph.12456>.
- Kandasamy, Lenin C., Mina Tsukamoto, Vitaliy Banov, Sambuu Tsetsegee, Yutaro Nagasawa, Mitsuhiro Kato, Naomichi Matsumoto, et al. 2021. "Limb-Clasping, Cognitive Deficit and Increased Vulnerability to Kainic Acid-Induced Seizures in Neuronal Glycosylphosphatidylinositol Deficiency Mouse Models." *Human Molecular Genetics* 30 (9): 758–70. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab052>.
- Kaneko, Takeshi. 2013. "Local Connections of Excitatory Neurons in Motor-Associated Cortical Areas of the Rat." *Frontiers in Neural Circuits* 7 (APR 2013): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00075>.
- Kann, Oliver, Ismini E. Papageorgiou, and Andreas Draguhn. 2014. "Highly Energized Inhibitory Interneurons Are a Central Element for Information Processing in Cortical Networks." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 34 (8): 1270–82. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.104>.
- Karube, Fuyuki, Yoshiyuki Kubota, and Yasuo Kawaguchi. 2004. "Axon Branching and Synaptic Bouton Phenotypes in GABAergic Nonpyramidal Cell Subtypes." *Journal of Neuroscience* 24 (12): 2853–65. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4814-03.2004>.
- Kayser, E B, Phil G. Morgan, and Margaret M. Sedensky. 1999. "GAS-1: A Mitochondrial Protein Controls Sensitivity to Volatile Anesthetics in the Nematode *Caenorhabditis Elegans*." *Anesthesiology* 90 (2): 545–54. <https://doi.org/10.1097/0000542-199902000-00031>.
- Kebschull, Justus M., Ethan B. Richman, Noam Ringach, Drew Friedmann, Eddy Albarran, Sai Saroja Kolluru, Robert C. Jones, et al. 2020. "Cerebellar Nuclei Evolved by Repeatedly Duplicating a Conserved Cell-Type Set." *Science* 370 (6523). <https://doi.org/10.1126/science.abd5059>.
- Khacho, Mireille, Richard Harris, and Ruth S. Slack. 2019. "Mitochondria as Central

## Referències

- Regulators of Neural Stem Cell Fate and Cognitive Function." *Nature Reviews Neuroscience* 20 (1): 34–48. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0091-3>.
- Khan, Kabir A., Jack L. McMurray, Fiyaz Mohammed, and Roy Bicknell. 2019. "C-type Lectin Domain Group 14 Proteins in Vascular Biology, Cancer and Inflammation." *The FEBS Journal* 286 (17): 3299–3332. <https://doi.org/10.1111/febs.14985>.
- Khazal, Fatimah Al, Molly Nelson Holte, Brad Bolon, Thomas A. White, Nathan LeBrasseur, and L. James Maher. 2019. "A Conditional Mouse Model of Complex II Deficiency Manifesting as Leigh-like Syndrome." *The FASEB Journal* 33 (12): 13189–201. <https://doi.org/10.1096/fj.201802655RR>.
- Kim, Hyeonhui, Minki Kim, Sun-Kyoung Im, and Sungsoo Fang. 2018. "Mouse Cre-LoxP System: General Principles to Determine Tissue-Specific Roles of Target Genes." *Laboratory Animal Research* 34 (4): 147. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>.
- Kim, Yong-sik, G Jean Harry, Hong Soon Kang, David Goulding, Rob N Wine, Grace E. Kissling, Grace Liao, and Anton M Jetten. 2010. "Altered Cerebellar Development in Nuclear Receptor TAK1/TR4 Null Mice Is Associated with Deficits in GLAST+ Glia, Alterations in Social Behavior, Motor Learning, Startle Reactivity, and Microglia." *The Cerebellum* 9 (3): 310–23. <https://doi.org/10.1007/s12311-010-0163-z>.
- Kirimoto, Hikari, Hiroyuki Tamaki, Takuya Matsumoto, Kazuhiro Sugawara, Makoto Suzuki, Mineo Oyama, and Hideaki Onishi. 2014. "Effect of Transcranial Static Magnetic Field Stimulation Over the Sensorimotor Cortex on Somatosensory Evoked Potentials in Humans." *Brain Stimulation* 7 (6): 836–40. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2014.09.016>.
- Klausberger, Thomas. 2005. "Complementary Roles of Cholecystokinin- and Parvalbumin-Expressing GABAergic Neurons in Hippocampal Network Oscillations." *Journal of Neuroscience* 25 (42): 9782–93. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3269-05.2005>.
- Klausberger, Thomas, and Peter Somogyi. 2008. "Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations." *Science* 321 (5885): 53–57. <https://doi.org/10.1126/science.1149381>.
- Komada, Munekazu, Keizo Takao, and Tsuyoshi Miyakawa. 2008. "Elevated Plus Maze for Mice." *Journal of Visualized Experiments*, no. 22 (December): 1–4. <https://doi.org/10.3791/1088>.
- Kontou, Georgina, Pantelis Antonoudiou, Marina Podpolny, Blanka R. Szulc, I. Lorena Arancibia-Carcamo, Nathalie F. Higgs, Guillermo Lopez-Domenech, Patricia C. Salinas, Edward O. Mann, and Josef T. Kittler. 2021. "Miro1-Dependent Mitochondrial Dynamics in Parvalbumin Interneurons." *ELife* 10 (June): 1–28. <https://doi.org/10.7554/eLife.65215>.
- Koolhaas, Jaap M., Caroline M. Coppens, Sietse F. de Boer, Bauke Buwalda, Peter Meerlo, and Paul J.A. Timmermans. 2013. "The Resident-Intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress." *Journal of Visualized Experiments*, no. 77 (July): 1–7. <https://doi.org/10.3791/4367>.
- Koopman, Werner J H, Felix Distelmaier, Jan A.M. Smeitink, and Peter H.G.M. Willems. 2012. "OXPHOS Mutations and Neurodegeneration." *The EMBO Journal* 32 (1): 9–29. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.300>.
- Kraeuter, Ann-Katrin, Paul C. Guest, and Zoltán Sarnyai. 2019a. "The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior." In , 99–103. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9).
- . 2019b. "The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice." In , 105–11. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10).

- Kroemer, Guido, Lorenzo Galluzzi, and Catherine Brenner. 2007. "Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death." *Physiological Reviews* 87 (1): 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>.
- Kropf, Erika, Sabrina K. Syan, Luciano Minuzzi, and Benicio N. Frey. 2019. "From Anatomy to Function: The Role of the Somatosensory Cortex in Emotional Regulation." *Brazilian Journal of Psychiatry* 41 (3): 261–69. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2018-0183>.
- Kruse, Shane E., William C. Watt, David J. Marcinek, Raj P. Kapur, Kenneth A. Schenkman, and Richard D. Palmiter. 2008. "Mice with Mitochondrial Complex I Deficiency Develop a Fatal Encephalomyopathy." *Cell Metabolism* 7 (4): 312–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.02.004>.
- Kubota, Yoshiyuki, Fuyuki Karube, Masaki Nomura, Allan T. Gullledge, Atsushi Mochizuki, Andreas Schertel, and Yasuo Kawaguchi. 2011. "Conserved Properties of Dendritic Trees in Four Cortical Interneuron Subtypes." *Scientific Reports* 1 (1): 89. <https://doi.org/10.1038/srep00089>.
- Kuleskaya, Natalia, and Vootele Voikar. 2014. "Assessment of Mouse Anxiety-like Behavior in the Light–Dark Box and Open-Field Arena: Role of Equipment and Procedure." *Physiology & Behavior* 133 (June): 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.006>.
- Lacourse, Karen A, Lisa J Swanberg, Patrick J Gillespie, Jens F Rehfeld, Thomas L Saunders, and Linda C Samuelson. 1999. "Pancreatic Function in CCK-Deficient Mice: Adaptation to Dietary Protein Does Not Require CCK." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 276 (5): G1302–9. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.5.G1302>.
- Lai, Ning-Sheng, Tzu-Fan Wang, Shiu-Lan Wang, Chun-Yu Chen, Jia-yi Yen, Hsien-lu Huang, Chin Li, et al. 2009. "Phostensin Caps to the Pointed End of Actin Filaments and Modulates Actin Dynamics." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 387 (4): 676–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.086>.
- Lake, Nicole J., Matthew J. Bird, Pirjo Isohanni, and Anders Paetau. 2015. "Leigh Syndrome: Neuropathology and Pathogenesis." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 74 (6): 482–92. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000195>.
- Lake, Nicole J., Alison G. Compton, Shamima Rahman, and David R. Thorburn. 2016. "Leigh Syndrome: One Disorder, More than 75 Monogenic Causes." *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.24551>.
- Lalonde, R., A.N. Bensoula, and M. Filali. 1995. "Rotorod Sensorimotor Learning in Cerebellar Mutant Mice." *Neuroscience Research* 22 (4): 423–26. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(95\)00916-H](https://doi.org/10.1016/0168-0102(95)00916-H).
- Lalonde, R., M. Dumont, M. Staufienbiel, and C. Strazielle. 2005. "Neurobehavioral Characterization of APP23 Transgenic Mice with the SHIRPA Primary Screen." *Behavioural Brain Research* 157 (1): 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.06.020>.
- Lalonde, R., T.L. Lewis, C. Strazielle, H. Kim, and K. Fukuchi. 2003. "Transgenic Mice Expressing the BAPP695SWE Mutation: Effects on Exploratory Activity, Anxiety, and Motor Coordination." *Brain Research* 977 (1): 38–45. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02694-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02694-5).
- Lalonde, R., and C. Strazielle. 2011. "Brain Regions and Genes Affecting Limb-Clasping Responses." *Brain Research Reviews* 67 (1–2): 252–59. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.02.005>.
- Lane, Nick, and William Martin. 2010. "The Energetics of Genome Complexity." *Nature* 467

## Referències

- (7318): 929–34. <https://doi.org/10.1038/nature09486>.
- Larkum, Matthew E, Lucy S Petro, Robert N S Sachdev, and Lars Muckli. 2018. "A Perspective on Cortical Layering and Layer-Spanning Neuronal Elements." *Frontiers in Neuroanatomy* 12 (July): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00056>.
- Lebre, Anne Sophie, M. Rio, L. Faivre d'Arcier, D. Vernerey, P. Landrieu, A. Slama, C. Jardel, et al. 2011. "A Common Pattern of Brain MRI Imaging in Mitochondrial Diseases with Complex I Deficiency." *Journal of Medical Genetics* 48 (1): 16–23. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.079624>.
- Lecea, Luis de, Jose A. del Río, and Eduardo Soriano. 1995. "Developmental Expression of Parvalbumin mRNA in the Cerebral Cortex and Hippocampus of the Rat." *Molecular Brain Research* 32 (1): 1–13. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00056-X](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00056-X).
- Lee, Anthony T., Daniel Vogt, John L. Rubenstein, and Vikaas S. Sohal. 2014. "A Class of GABAergic Neurons in the Prefrontal Cortex Sends Long-Range Projections to the Nucleus Accumbens and Elicits Acute Avoidance Behavior." *Journal of Neuroscience* 34 (35): 11519–25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1157-14.2014>.
- Lee, Soo Yeun, and Ivan Soltesz. 2011. "Cholecystokinin: A Multi-Functional Molecular Switch of Neuronal Circuits." *Developmental Neurobiology* 71 (1): 83–91. <https://doi.org/10.1002/dneu.20815>.
- Leigh, D. 1951. "SUBACUTE NECROTIZING ENCEPHALOMYELOPATHY IN AN INFANT." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 14 (3): 216–21. <https://doi.org/10.1136/jnnp.14.3.216>.
- Lein, Ed S., Michael J. Hawrylycz, Nancy Ao, Mikael Ayres, Amy Bensinger, Amy Bernard, Andrew F. Boe, et al. 2007. "Genome-Wide Atlas of Gene Expression in the Adult Mouse Brain." *Nature* 445 (7124): 168–76. <https://doi.org/10.1038/nature05453>.
- Leone, Dino P., Karpagam Srinivasan, Bin Chen, Elizabeth Alcamo, and Susan K. McConnell. 2008. "The Determination of Projection Neuron Identity in the Developing Cerebral Cortex." *Current Opinion in Neurobiology* 18 (1): 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.05.006>.
- Letts, James A., and Leonid A. Sazanov. 2017. "Clarifying the Supercomplex: The Higher-Order Organization of the Mitochondrial Electron Transport Chain." *Nature Structural & Molecular Biology* 24 (10): 800–808. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3460>.
- Letzkus, Johannes J., Steffen B. E. Wolff, Elisabeth M. M. Meyer, Philip Tovote, Julien Courtin, Cyril Herry, and Andreas Lüthi. 2011. "A Disinhibitory Microcircuit for Associative Fear Learning in the Auditory Cortex." *Nature* 480 (7377): 331–35. <https://doi.org/10.1038/nature10674>.
- Liang, Danny, Sergei Bhatta, Volodymyr Gerzanich, and J. Marc Simard. 2007. "Cytotoxic Edema: Mechanisms of Pathological Cell Swelling." *Neurosurgical Focus* 22 (5): 1–9. <https://doi.org/10.3171/foc.2007.22.5.3>.
- Lim, Rebecca, Marcus J. Zavou, Phillipa-Louise Milton, Siow Teng Chan, Jean L. Tan, Hayley Dickinson, Sean V. Murphy, Graham Jenkin, and Euan M. Wallace. 2014. "Measuring Respiratory Function in Mice Using Unrestrained Whole-Body Plethysmography." *Journal of Visualized Experiments*, no. 90 (August): 1–11. <https://doi.org/10.3791/51755>.
- Lin, Yu-Shan, Kuang-Yung Huang, Tzu-Fan Wang, Hsien-lu Huang, Hui-Chun Yu, Jia-yi Yen, Shih-hui Hung, Su-Qin Liu, Ning-Sheng Lai, and Hsien-bin Huang. 2011. "Immunolocalization of Phostensin in Lymphatic Cells and Tissues." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59 (8): 741–49.

- <https://doi.org/10.1369/0022155411411303>.
- Liu, Chun, Zhichao Cui, Shengjie Wang, and Dongmei Zhang. 2014. "CD93 and GIPC Expression and Localization during Central Nervous System Inflammation." *Neural Regeneration Research* 9 (22): 1995–2001. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.145383>.
- Lo, Chun-Min, Linda C. Samuelson, James Brad Chambers, Alexandra King, Justin Heiman, Ronald J. Jandacek, Randall R. Sakai, et al. 2008. "Characterization of Mice Lacking the Gene for Cholecystokinin." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294 (3): R803–10. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00682.2007>.
- Loeffen, Jan, Jan A.M. Smeitink, Ralf Triepels, Roel Smeets, Markus Schuelke, Rob Sengers, Frans Trijbels, Ben Hamel, Renier Mullaart, and Lambert Den Van Heuvel. 1998. "The First Nuclear-Encoded Complex I Mutation in a Patient with Leigh Syndrome." *American Journal of Human Genetics* 63 (6): 1598–1608. <https://doi.org/10.1086/302154>.
- Loewen, Carin A, and Barry Ganetzky. 2018. "Mito-Nuclear Interactions Affecting Lifespan and Neurodegeneration in a Drosophila Model of Leigh Syndrome." *Genetics* 208 (4): 1535–52. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300818>.
- Lopez-Bendito, G., J. A. Sanchez-Alcaniz, Ramón Pla, Víctor Borrell, E. Pico, Miguel Valdeolmillos, and O. Marin. 2008. "Chemokine Signaling Controls Intracortical Migration and Final Distribution of GABAergic Interneurons." *Journal of Neuroscience* 28 (7): 1613–24. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4651-07.2008>.
- López-Doménech, Guillermo, Nathalie F. Higgs, Victoria Vaccaro, Hana Roš, I. Lorena Arancibia-Cárcamo, Andrew F. MacAskill, and Josef T. Kittler. 2016. "Loss of Dendritic Complexity Precedes Neurodegeneration in a Mouse Model with Disrupted Mitochondrial Distribution in Mature Dendrites." *Cell Reports* 17 (2): 317–27. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.004>.
- López, Luis Carlos, Markus Schuelke, Catarina M. Quinzii, Tomotake Kanki, Richard J.T. Rodenburg, Ali Naini, Salvatore DiMauro, and Michio Hirano. 2006. "Leigh Syndrome with Nephropathy and CoQ10 Deficiency Due to Decaprenyl Diphosphate Synthase Subunit 2 (PDSS2) Mutations." *The American Journal of Human Genetics* 79 (6): 1125–29. <https://doi.org/10.1086/510023>.
- Lou, H. C. 1981. "Correction of Increased Plasma Pyruvate and Plasma Lactate Levels Using Large Doses of Thiamine in Patients With Kearns-Sayre Syndrome." *Archives of Neurology* 38 (7): 469–469. <https://doi.org/10.1001/archneur.1981.00510070103027>.
- Loubinoux, Isabelle, A. Volk, J. Borredon, S. Guirimand, B. Tiffon, J. Seylaz, and P. Méric. 1997. "Spreading of Vasogenic Edema and Cytotoxic Edema Assessed by Quantitative Diffusion and T2 Magnetic Resonance Imaging." *Stroke* 28 (2): 419–27. <https://doi.org/10.1161/01.STR.28.2.419>.
- MacAskill, Andrew F., and Josef T. Kittler. 2010. "Control of Mitochondrial Transport and Localization in Neurons." *Trends in Cell Biology* 20 (2): 102–12. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.11.002>.
- MacIver, M. Bruce. 2014. "Anesthetic Agent-Specific Effects on Synaptic Inhibition." *Anesthesia & Analgesia* 119 (3): 558–69. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000321>.
- Madisen, Linda, Theresa A. Zwingman, Susan M. Sunkin, Seung Wook Oh, Hatim A. Zariwala, Hong Gu, Lydia L. Ng, et al. 2010. "A Robust and High-Throughput Cre Reporting and Characterization System for the Whole Mouse Brain." *Nature Neuroscience* 13 (1):



## Referències

- 133–40. <https://doi.org/10.1038/nn.2467>.
- Maldergem, Lionel Van, Frans Trijbels, Salvatore DiMauro, Pavel J. Sindelar, Olimpia Musumeci, Antoon Janssen, Xavier Delberghe, Jean-Jacques Martin, and Yves Gillerot. 2002. "Coenzyme Q- Responsive Leigh's Encephalopathy in Two Sisters." *Annals of Neurology* 52 (6): 750–54. <https://doi.org/10.1002/ana.10371>.
- Mandillo, Silvia, Valter Tucci, Sabine M. Höltter, Hamid Meziane, Mumna Al Banachaabouchi, Magdalena Kallnik, Heena V. Lad, et al. 2008. "Reliability, Robustness, and Reproducibility in Mouse Behavioral Phenotyping: A Cross-Laboratory Study." *Physiological Genomics* 34 (3): 243–55. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90207.2008>.
- Manto, Mario, James M Bower, Adriana Bastos Conforto, José M Delgado-García, Suzete Nascimento Farias da Guarda, Marcus Gerwig, Christophe Habas, et al. 2012. "Consensus Paper: Roles of the Cerebellum in Motor Control—The Diversity of Ideas on Cerebellar Involvement in Movement." *The Cerebellum* 11 (2): 457–87. <https://doi.org/10.1007/s12311-011-0331-9>.
- Maragakis, Nicholas J., and Jeffrey D. Rothstein. 2006. "Mechanisms of Disease: Astrocytes in Neurodegenerative Disease." *Nature Clinical Practice Neurology* 2 (12): 679–89. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0355>.
- Marceau, François, and Domenico Regoli. 2004. "Bradykinin Receptor Ligands: Therapeutic Perspectives." *Nature Reviews Drug Discovery* 3 (10): 845–52. <https://doi.org/10.1038/nrd1522>.
- Marec, N. Le, and R. Lalonde. 1997. "Sensorimotor Learning and Retention during Equilibrium Tests in Purkinje Cell Degeneration Mutant Mice." *Brain Research* 768 (1–2): 310–16. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00666-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00666-5).
- Marín, Oscar. 2012. "Interneuron Dysfunction in Psychiatric Disorders." *Nature Reviews Neuroscience* 13 (2): 107–20. <https://doi.org/10.1038/nrn3155>.
- Marín, Oscar, and John L.R. Rubenstein. 2003. "CELL MIGRATION IN THE FOREBRAIN." *Annual Review of Neuroscience* 26 (1): 441–83. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058>.
- Martin, Fiona A., Ronan P. Murphy, and Philip M. Cummins. 2013. "Thrombomodulin and the Vascular Endothelium: Insights into Functional, Regulatory, and Therapeutic Aspects." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 304 (12): H1585–97. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00096.2013>.
- Martínez-Reyes, Inmaculada, and Navdeep S. Chandel. 2020. "Mitochondrial TCA Cycle Metabolites Control Physiology and Disease." *Nature Communications* 11 (1): 102. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>.
- Maruyama, I., and P. W. Majerus. 1985. "The Turnover of Thrombin-Thrombomodulin Complex in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells and A549 Lung Cancer Cells. Endocytosis and Degradation of Thrombin." *Journal of Biological Chemistry* 260 (29): 15432–38. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36272-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36272-5).
- Masamizu, Yoshito, Yasuhiro R Tanaka, Yasuyo H. Tanaka, Riichiro Hira, Fuki Ohkubo, Kazuo Kitamura, Yoshikazu Isomura, Takashi Okada, and Masanori Matsuzaki. 2014. "Two Distinct Layer-Specific Dynamics of Cortical Ensembles during Learning of a Motor Task." *Nature Neuroscience* 17 (7): 987–94. <https://doi.org/10.1038/nn.3739>.
- Matho, Katherine S., Dhananjay Huilgol, William Galbavy, Miao He, Gukhan Kim, Xu An, Jiangteng Lu, et al. 2021. "Genetic Dissection of the Glutamatergic Neuron System in Cerebral Cortex." *Nature* 598 (7879): 182–87. <https://doi.org/10.1038/s41586-021->

- 03955-9.
- Matsumoto, Kinzo, Graziano Pinna, Giuli Puia, Alessandro Guidotti, and Erminio Costa. 2005. "Social Isolation Stress-Induced Aggression in Mice: A Model to Study the Pharmacology of Neurosteroidogenesis." *Stress* 8 (2): 85–93. <https://doi.org/10.1080/10253890500159022>.
- Mayer, M. P., and B. Bukau. 2005. "Hsp70 Chaperones: Cellular Functions and Molecular Mechanism." *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (6): 670–84. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>.
- McCormick, Elizabeth M., Zarazuela Zolkipli-Cunningham, and Marni J. Falk. 2018. "Mitochondrial Disease Genetics Update." *Current Opinion in Pediatrics* 30 (6): 714–24. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000686>.
- McHail, Daniel G., and Theodore C Dumas. 2020. "Hippocampal Gamma Rhythms during Y-maze Navigation in the Juvenile Rat." *Hippocampus* 30 (5): 505–25. <https://doi.org/10.1002/hipo.23168>.
- McKechnie, Liz, Chakra Vasudevan, and Malcolm Levene. 2012. "Neonatal Outcome of Congenital Ventriculomegaly." *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 17 (5): 301–7. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2012.06.001>.
- McManamny, Patrick. 2002. "A Mouse Model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 11 (18): 2103–11. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.18.2103>.
- Melzer, Sarah, Mariana Gil, David E. Koser, Magdalena Michael, Kee Wui Huang, and Hannah Monyer. 2017. "Distinct Corticostriatal GABAergic Neurons Modulate Striatal Output Neurons and Motor Activity." *Cell Reports* 19 (5): 1045–55. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.024>.
- Melzer, Sarah, and Hannah Monyer. 2020. "Diversity and Function of Corticopetal and Corticofugal GABAergic Projection Neurons." *Nature Reviews Neuroscience* 21 (9): 499–515. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0344-9>.
- Michinaga, Shotaro, and Yutaka Koyama. 2015. "Pathogenesis of Brain Edema and Investigation into Anti-Edema Drugs." *International Journal of Molecular Sciences* 16 (12): 9949–75. <https://doi.org/10.3390/ijms16059949>.
- Migliore, Michele, and Gordon M. Shepherd. 2005. "An Integrated Approach to Classifying Neuronal Phenotypes." *Nature Reviews Neuroscience* 6 (10): 810–18. <https://doi.org/10.1038/nrn1769>.
- Minamisawa, Genki, Sung Eun Kwon, Maxime Chevée, Solange P. Brown, and Daniel H. O'Connor. 2018. "A Non-Canonical Feedback Circuit for Rapid Interactions between Somatosensory Cortices." *Cell Reports* 23 (9): 2718–2731.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.115>.
- Minn, Alexandra H., Christian Hafele, and Anath Shalev. 2005. "Thioredoxin-Interacting Protein Is Stimulated by Glucose through a Carbohydrate Response Element and Induces  $\beta$ -Cell Apoptosis." *Endocrinology* 146 (5): 2397–2405. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1378>.
- Mishra, Prashant, and David C. Chan. 2014. "Mitochondrial Dynamics and Inheritance during Cell Division, Development and Disease." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (10): 634–46. <https://doi.org/10.1038/nrm3877>.
- Mohamed, Islam N., Tauheed Ishrat, Susan C. Fagan, and Azza B. El-Remessy. 2015. "Role of Inflammasome Activation in the Pathophysiology of Vascular Diseases of the Neurovascular Unit." *Antioxidants & Redox Signaling* 22 (13): 1188–1206. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6126>.

## Referències

- Molyneaux, Bradley J., Paola Arlotta, Joao R. L. Menezes, and Jeffrey D. Macklis. 2007. "Neuronal Subtype Specification in the Cerebral Cortex." *Nature Reviews Neuroscience* 8 (6): 427–37. <https://doi.org/10.1038/nrn2151>.
- Morgan, Phil G., Charles L. Hoppel, and Margaret M. Sedensky. 2002. "Mitochondrial Defects and Anesthetic Sensitivity." *Anesthesiology* 96 (5): 1268–70. <https://doi.org/10.1097/0000542-200205000-00036>.
- Morgan, Phil G, E-B Kayser, and M M Sedensky. 2007. "C. Elegans and Volatile Anesthetics." *WormBook : The Online Review of C. Elegans Biology*, May, 1–11. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.140.1>.
- Morino, P., M. Herrera-Marschitz, M. N. Castel, U. Ungerstedt, A. Varro, G. Dockray, and T. Hökfelt. 1994. "Cholecystokinin in Cortico-Striatal Neurons in the Rat: Immunohistochemical Studies at the Light and Electron Microscopical Level." *European Journal of Neuroscience* 6 (5): 681–92. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1994.tb00980.x>.
- Mottis, Adrienne, Sébastien Herzig, and Johan Auwerx. 2019. "Mitocellular Communication: Shaping Health and Disease." *Science* 366 (6467): 827–32. <https://doi.org/10.1126/science.aax3768>.
- Muchowski, Paul J., and Jennifer L. Wacker. 2005. "Modulation of Neurodegeneration by Molecular Chaperones." *Nature Reviews Neuroscience* 6 (1): 11–22. <https://doi.org/10.1038/nrn1587>.
- Muñoz-Ortiz, J., E. Muñoz-Ortiz, M.L. López-Meraz, L. Beltran-Parrazal, and C. Morgado-Valle. 2019. "El Complejo Pre-Bötzinger: Generación y Modulación Del Ritmo Respiratorio." *Neurología* 34 (7): 461–68. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.05.011>.
- Muret, Dollyane, and Tamar R. Makin. 2021. "The Homeostatic Homunculus: Rethinking Deprivation-Triggered Reorganisation." *Current Opinion in Neurobiology* 67 (April): 115–22. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.08.008>.
- Nadarajah, Bagirathy, Janice E. Brunstrom, Jaime Grutzendler, Rachel O. L. Wong, and Alan L. Pearlman. 2001. "Two Modes of Radial Migration in Early Development of the Cerebral Cortex." *Nature Neuroscience* 4 (2): 143–50. <https://doi.org/10.1038/83967>.
- Nagashima, T., Masamitsu Mori, Katsuyuki Katayama, Mitsuru Nunomura, Hiroshi Nishihara, Hiroaki Hiraga, Shinya Tanaka, Yu-ichi Goto, and Kazuo Nagashima. 1999. "Adult Leigh Syndrome with Mitochondrial DNA Mutation at 8993." *Acta Neuropathologica* 97 (4): 416–22. <https://doi.org/10.1007/s004010051007>.
- Nakamura, Yoichi. 2002. "Regulating Factors for Microglial Activation." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25 (8): 945–53. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.945>.
- Nasoohi, Sanaz, Saifudeen Ismael, and Tauheed Ishrat. 2018. "Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) in Cerebrovascular and Neurodegenerative Diseases: Regulation and Implication." *Molecular Neurobiology* 55 (10): 7900–7920. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0917-z>.
- National Center for Biotechnology Information. 2021. "9130017K11Rik RIKEN CDNA 9130017K11 Gene." 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/72804>.
- Navarro, Xavier, and Esther Udina. 2009. "Chapter 6 Methods and Protocols in Peripheral Nerve Regeneration Experimental Research." In *International Review of Neurobiology*, 1st ed., 87:105–26. Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)87006-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)87006-2).
- Nepomuceno, R R, and A J Tenner. 1998. "C1qRP, the C1q Receptor That Enhances Phagocytosis, Is Detected Specifically in Human Cells of Myeloid Lineage, Endothelial Cells, and Platelets." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160 (4): 1929–35.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9469455>.
- Nestor, Sean M., Raul Rupsingh, Michael Borrie, Matthew Smith, Vittorio Accomazzi, Jennie L. Wells, Jennifer Fogarty, and Robert Bartha. 2008. "Ventricular Enlargement as a Possible Measure of Alzheimer's Disease Progression Validated Using the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative Database." *Brain* 131 (9): 2443–54. <https://doi.org/10.1093/brain/awn146>.
- Nguyen, John D., and Hieu Duong. 2021. *Neurosurgery, Sensory Homunculus. StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31751031>.
- Nguyen, Robin, Sridevi Venkatesan, Mary Binko, Jee Yoon Bang, Janine D. Cajanding, Chloe Briggs, Derya Sargin, Itaru Imayoshi, Evelyn K. Lambe, and Jun Chul Kim. 2020. "Cholecystokinin-Expressing Interneurons of the Medial Prefrontal Cortex Mediate Working Memory Retrieval." *The Journal of Neuroscience* 40 (11): 2314–31. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1919-19.2020>.
- Nikoletopoulou, Vassiliki, Maria Markaki, Konstantinos Palikaras, and Nektarios Tavernarakis. 2013. "Crosstalk between Apoptosis, Necrosis and Autophagy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (12): 3448–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>.
- Nissanka, Nadee, and Carlos T Moraes. 2020. "Mitochondrial DNA Heteroplasmy in Disease and Targeted Nuclease-based Therapeutic Approaches." *EMBO Reports* 21 (3): 1–12. <https://doi.org/10.15252/embr.201949612>.
- Niyazov, Dmitriy M., Stephan G. Kahler, and Richard E. Frye. 2016. "Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment." *Molecular Syndromology* 7 (3): 122–37. <https://doi.org/10.1159/000446586>.
- Noble, F., and B. P. Roques. 2006. "Cholecystokinin Peptides in Brain Function." In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, 545–71. Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-30381-9\\_24](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30381-9_24).
- Noctor, Stephen C., Verónica Martínez-Cerdeño, Lidija Ivic, and Arnold R. Kriegstein. 2004. "Cortical Neurons Arise in Symmetric and Asymmetric Division Zones and Migrate through Specific Phases." *Nature Neuroscience* 7 (2): 136–44. <https://doi.org/10.1038/nn1172>.
- Nogueira, Célia, Lisbeth Silva, Cristina Pereira, Luís Vieira, Elisa Leão Teles, Esmeralda Rodrigues, Teresa Campos, et al. 2019. "Targeted next Generation Sequencing Identifies Novel Pathogenic Variants and Provides Molecular Diagnoses in a Cohort of Pediatric and Adult Patients with Unexplained Mitochondrial Dysfunction." *Mitochondrion* 47 (July): 309–17. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.02.006>.
- Nolfi-Donagan, Deirdre, Andrea Braganza, and Sruti Shiva. 2020. "Mitochondrial Electron Transport Chain: Oxidative Phosphorylation, Oxidant Production, and Methods of Measurement." *Redox Biology* 37 (October): 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>.
- Nunnari, Jodi, and Anu Suomalainen. 2012. "Mitochondria: In Sickness and in Health." *Cell* 148 (6): 1145–59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>.
- Ohtake, MASATOSHI, GORO TAKADA, SHIGEAKI MIYABAYASHI, NOBUHIRO ARAI, KEIYA TADA, and SHOJIROH MORINAGA. 1982. "Pyruvate Decarboxylase Deficiency in a Patient with Leigh's Encephalomyelopathy." *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 137 (4): 379–86. <https://doi.org/10.1620/tjem.137.379>.
- Oncul, Selin, and Vahid Afshar-Kharghan. 2020. "The Interaction between the Complement System and Hemostatic Factors." *Current Opinion in Hematology* 27 (5): 341–52.

## Referències

- <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000605>.
- Ortigoza-Escobar, Juan Darío, Alfonso Oyarzabal, Raquel Montero, Rafael Artuch, Cristina Jou, Cecilia Jiménez, Laura Gort, et al. 2016. "Ndufs4 Related Leigh Syndrome: A Case Report and Review of the Literature." *Mitochondrion* 28 (May): 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.04.001>.
- Ortigoza-Escobar, Juan Darío, Mercedes Serrano, Marta Molero, Alfonso Oyarzabal, Mónica Rebollo, Jordi Muchart, Rafael Artuch, Pilar Rodríguez-Pombo, and Belén Pérez-Dueñas. 2014. "Thiamine Transporter-2 Deficiency: Outcome and Treatment Monitoring." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 9 (1): 92. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-9-92>.
- Ostergaard, Elsebet, Flemming J. Hansen, Nicolina Sorensen, Morten Duno, John Vissing, Pernille L. Larsen, Oddmar Faeroe, et al. 2007. "Mitochondrial Encephalomyopathy with Elevated Methylmalonic Acid Is Caused by SUCLA2 Mutations." *Brain* 130 (3): 853–61. <https://doi.org/10.1093/brain/awl383>.
- Ott, Martin, Vladimir Gogvadze, Sten Orrenius, and Boris Zhivotovsky. 2007. "Mitochondria, Oxidative Stress and Cell Death." *Apoptosis* 12 (5): 913–22. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>.
- Padilla, Stephanie L., Jian Qiu, Marta E. Soden, Elisenda Sanz, Casey C Nestor, Forrest D. Barker, Albert Quintana, et al. 2016. "Agouti-Related Peptide Neural Circuits Mediate Adaptive Behaviors in the Starved State." *Nature Neuroscience* 19 (5): 734–41. <https://doi.org/10.1038/nn.4274>.
- Palve, Suchitra Sachin, and Sachin Bhaskar Palve. 2018. "Impact of Aging on Nerve Conduction Velocities and Late Responses in Healthy Individuals." *Journal of Neurosciences in Rural Practice* 09 (01): 112–16. [https://doi.org/10.4103/jnrp.jnrp\\_323\\_17](https://doi.org/10.4103/jnrp.jnrp_323_17).
- Parey, Kristian, Outi Haapanen, Vivek Sharma, Harald Köfeler, Thomas Züllig, Simone Prinz, Karin Siegmund, et al. 2019. "High-Resolution Cryo-EM Structures of Respiratory Complex I: Mechanism, Assembly, and Disease." *Science Advances* 5 (12): 1–11. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax9484>.
- Parey, Kristian, Christophe Wirth, Janet Vonck, and Volker Zickermann. 2020. "Respiratory Complex I — Structure, Mechanism and Evolution." *Current Opinion in Structural Biology* 63 (August): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.01.004>.
- Passingham, R. E., V. H. Perry, and F. Wilkinson. 1983. "THE LONG-TERM EFFECTS OF REMOVAL OF SENSORIMOTOR CORTEX IN INFANT AND ADULT RHESUS MONKEYS." *Brain* 106 (3): 675–705. <https://doi.org/10.1093/brain/106.3.675>.
- Paul, Anirban, Megan Crow, Ricardo Raudales, Miao He, Jesse Gillis, and Z. Josh Huang. 2017. "Transcriptional Architecture of Synaptic Communication Delineates GABAergic Neuron Identity." *Cell* 171 (3): 522–539.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.032>.
- Pavlidis, C., E. Miyashita, and H. Asanuma. 1993. "Projection from the Sensory to the Motor Cortex Is Important in Learning Motor Skills in the Monkey." *Journal of Neurophysiology* 70 (2): 733–41. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.2.733>.
- Pearce, Sarah F., Pedro Rebelo-Guimar, Aaron R. D'Souza, Christopher A. Powell, Lindsey Van Haute, and Michal Minczuk. 2017. "Regulation of Mammalian Mitochondrial Gene Expression: Recent Advances." *Trends in Biochemical Sciences* 42 (8): 625–39. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.003>.
- Pekny, Milos, Marcela Pekna, Albee Messing, Christian Steinhäuser, Jin Moo Lee, Vladimir

- Parpura, Elly M. Hol, Michael V. Sofroniew, and Alexei Verkhratsky. 2016. "Astrocytes: A Central Element in Neurological Diseases." *Acta Neuropathologica* 131 (3): 323–45. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1513-1>.
- Pereira, Claudia V, Sandra R Bacman, Tania Arguello, Ugne Zekonyte, Sion L Williams, David R Edgell, and Carlos T Moraes. 2018. "MitoTev-TALE: A Monomeric DNA Editing Enzyme to Reduce Mutant Mitochondrial DNA Levels." *EMBO Molecular Medicine* 10 (9): 1–11. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708084>.
- Peters, Andrew J., Haixin Liu, and Takaki Komiyama. 2017. "Learning in the Rodent Motor Cortex." *Annual Review of Neuroscience* 40 (1): 77–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031407>.
- Petrof, Iraklis, Angela N. Viaene, and S. Murray Sherman. 2015. "Properties of the Primary Somatosensory Cortex Projection to the Primary Motor Cortex in the Mouse." *Journal of Neurophysiology* 113 (7): 2400–2407. <https://doi.org/10.1152/jn.00949.2014>.
- Philippova, Maria, Manjunath B. Joshi, Emmanouil Kyriakakis, Dennis Pfaff, Paul Erne, and Therese J. Resink. 2009. "A Guide and Guard: The Many Faces of T-Cadherin." *Cellular Signalling* 21 (7): 1035–44. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.01.035>.
- Phillips, Greg R., Nicole LaMassa, and Yan Mei Nie. 2017. "Clustered Protocadherin Trafficking." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 69 (September): 131–39. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.001>.
- Pino, Isabel del, Jorge R. Brotons-Mas, André Marques-Smith, Aline Marighetto, Andreas Frick, Oscar Marín, and Beatriz Rico. 2017. "Abnormal Wiring of CCK+ Basket Cells Disrupts Spatial Information Coding." *Nature Neuroscience* 20 (6): 784–92. <https://doi.org/10.1038/nn.4544>.
- Pisanski, Annette, and Silvia Pagliardini. 2019. "The Parafacial Respiratory Group and the Control of Active Expiration." *Respiratory Physiology & Neurobiology* 265 (July): 153–60. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.06.010>.
- Pisapia, Jared M., Saurabh Sinha, Deborah M. Zarnow, Mark P. Johnson, and Gregory G. Heuer. 2017. "Fetal Ventriculomegaly: Diagnosis, Treatment, and Future Directions." *Child's Nervous System* 33 (7): 1113–23. <https://doi.org/10.1007/s00381-017-3441-y>.
- Pond, Heather L., Abigail T. Heller, Brian M. Gural, Olivia P. McKissick, Molly K. Wilkinson, and M. Chiara Manzini. 2021. "Digging Behavior Discrimination Test to Probe Burrowing and Exploratory Digging in Male and Female Mice." *Journal of Neuroscience Research* 99 (9): 2046–58. <https://doi.org/10.1002/jnr.24857>.
- Prada-Dacasa, Patricia, Andrea Urpi, Laura Sánchez-Benito, Patrizia Bianchi, and Albert Quintana. 2020. "Measuring Breathing Patterns in Mice Using Whole-Body Plethysmography." *BIO-PROTOCOL* 10 (17): 1–13. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3741>.
- Prasad, Judy A., Briana J. Carroll, and S. Murray Sherman. 2020. "Layer 5 Corticofugal Projections from Diverse Cortical Areas: Variations on a Pattern of Thalamic and Extrathalamic Targets." *The Journal of Neuroscience* 40 (30): 5785–96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0529-20.2020>.
- Price, David J., Henry Kennedy, Colette Dehay, Libing Zhou, Marjorie Mercier, Yves Jossin, André M. Goffinet, Fadel Tissir, Daniel Blakey, and Zoltán Molnár. 2006. "The Development of Cortical Connections." *European Journal of Neuroscience* 23 (4): 910–20. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04620.x>.
- Puighermanal, Emma, Laia Castell, Anna Esteve-Codina, Su Melser, Konstantin Kaganovsky, Charleine Zussy, Jihane Boubaker-Vitre, et al. 2020. "Functional and Molecular Heterogeneity of D2R Neurons along Dorsal Ventral Axis in the Striatum." *Nature*

## Referències

- Communications* 11 (1): 1957. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15716-9>.
- Pulliam, Daniel A., Sathyaseelan S. Deepa, Yuhong Liu, Shauna Hill, Ai-Ling Lin, Arunabh Bhattacharya, Yun Shi, et al. 2014. "Complex IV-Deficient Surf1-/- Mice Initiate Mitochondrial Stress Responses." *Biochemical Journal* 462 (2): 359–71. <https://doi.org/10.1042/BJ20140291>.
- Quintana, Albert, Shane E. Kruse, Raj P. Kapur, Elisenda Sanz, and Richard D. Palmiter. 2010. "Complex I Deficiency Due to Loss of Ndufs4 in the Brain Results in Progressive Encephalopathy Resembling Leigh Syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (24): 10996–1. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006214107>.
- Quintana, Albert, Philip G. Morgan, Shane E. Kruse, Richard D. Palmiter, and Margaret M. Sedensky. 2012. "Altered Anesthetic Sensitivity of Mice Lacking Ndufs4, a Subunit of Mitochondrial Complex I." Edited by Zhongcong Xie. *PLoS ONE* 7 (8): e42904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042904>.
- Quintana, Albert, Sebastien Zanella, Henner Koch, Shane E. Kruse, Donghoon Lee, Jan M. Ramirez, and Richard D. Palmiter. 2012. "Fatal Breathing Dysfunction in a Mouse Model of Leigh Syndrome." *Journal of Clinical Investigation* 122 (7): 2359–68. <https://doi.org/10.1172/JCI62923>.
- Quirós, Pedro M., Adrienne Mottis, and Johan Auwerx. 2016. "Mitonuclear Communication in Homeostasis and Stress." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (4): 213–26. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.23>.
- Radons, Jürgen. 2016. "The Human HSP70 Family of Chaperones: Where Do We Stand?" *Cell Stress and Chaperones* 21 (3): 379–404. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0676-6>.
- Raha, Sandeep, and Brian H. Robinson. 2001. "Mitochondria, Oxygen Free Radicals, and Apoptosis." *American Journal of Medical Genetics* 106 (1): 62–70. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1398>.
- Rahman, Joyeeta, and Shamima Rahman. 2018. "Mitochondrial Medicine in the Omics Era." *The Lancet* 391 (10139): 2560–74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30727-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30727-X).
- Rahman, S, R. B. Blok, H.-H. M. Dahl, D. M. Danks, D. M. Kirby, C. W. Chow, J Christodoulou, and D R Thorburn. 1996. "Leigh Syndrome: Clinical Features and Biochemical and DNA Abnormalities." *Annals of Neurology* 39 (3): 343–51. <https://doi.org/10.1002/ana.410390311>.
- Ramadasan-Nair, Renjini, Jessica Hui, Pavel I. Zimin, Leslie S. Itsara, Philip G. Morgan, and Margaret M. Sedensky. 2017. "Regional Knockdown of NDUFS4 Implicates a Thalamocortical Circuit Mediating Anesthetic Sensitivity." Edited by Jialin Charles Zheng. *PLOS ONE* 12 (11): e0188087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188087>.
- Ramhøj, Louise, Marta Axelstad, and Terje Svingen. 2019. "Validation of Endogenous Reference Genes in Rat Cerebral Cortex for RT-QPCR Analyses in Developmental Toxicity Studies." *PeerJ* 7 (6): e7181. <https://doi.org/10.7717/peerj.7181>.
- Ramón y Cajal, Santiago. 1988. "Estudios Sobre La Corteza Cerebral Humana. I." *Región Visual. Revista Trimestral Micrográfica* 4 (1–63).
- Rath, Sneha, Rohit Sharma, Rahul Gupta, Tslil Ast, Connie Chan, Timothy J. Durham, Russell P. Goodman, et al. 2021. "MitoCarta3.0: An Updated Mitochondrial Proteome Now with Sub-Organellar Localization and Pathway Annotations." *Nucleic Acids Research* 49 (D1): D1541–47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1011>.
- Rawi, Sara Al, S. Louvet-Vallee, A Djeddi, M. Sachse, E. Culetto, C. Hajjar, L Boyd, R Legouis, and V Galy. 2011. "Postfertilization Autophagy of Sperm Organelles Prevents Paternal

- Mitochondrial DNA Transmission." *Science* 334 (6059): 1144–47.  
<https://doi.org/10.1126/science.1211878>.
- Richman, Tara R., Henrik Spahr, Judith A. Ermer, Stefan M.K. Davies, Helena M. Viola, Kristyn A. Bates, John Papadimitriou, et al. 2016. "Loss of the RNA-Binding Protein TACO1 Causes Late-Onset Mitochondrial Dysfunction in Mice." *Nature Communications* 7 (May): 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms11884>.
- Rigoulet, Michel, Edgar D. Yoboue, and Anne Devin. 2011. "Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signaling." *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (3): 459–68. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3363>.
- Rio, José Antonio del, L. de Lecea, Isidro Ferrer, and Eduardo Soriano. 1994. "The Development of Parvalbumin-Immunoreactivity in the Neocortex of the Mouse." *Developmental Brain Research* 81 (2): 247–59. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(94\)90311-5](https://doi.org/10.1016/0165-3806(94)90311-5).
- Rivner, Michael H., Thomas R. Swift, and Khalid Malik. 2001. "Influence of Age and Height on Nerve Conduction." *Muscle & Nerve* 24 (9): 1134–41.  
<https://doi.org/10.1002/mus.1124>.
- Rocco-Donovan, Mary, Raddy L. Ramos, Sandra Giraldo, and Joshua C. Brumberg. 2011. "Characteristics of Synaptic Connections between Rodent Primary Somatosensory and Motor Cortices." *Somatosensory & Motor Research* 28 (3–4): 63–72.  
<https://doi.org/10.3109/08990220.2011.606660>.
- Rock, Crystal, Hector Zurita, Sharmon Lebby, Charles J. Wilson, and Alfonso Junior Apicella. 2018. "Cortical Circuits of Callosal GABAergic Neurons." *Cerebral Cortex* 28 (4): 1154–67. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx025>.
- Rolfe, David F.S., and Guy C. Brown. 1997. "Cellular Energy Utilization and Molecular Origin of Standard Metabolic Rate in Mammals." *Physiological Reviews* 77 (3): 731–58.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.731>.
- Rossi, Alice, Paola Pizzo, and Riccardo Filadi. 2019. "Calcium, Mitochondria and Cell Metabolism: A Functional Triangle in Bioenergetics." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1866 (7): 1068–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.016>.
- Ruden, Jacob B., Laura L. Dugan, and Christine Konradi. 2021. "Parvalbumin Interneuron Vulnerability and Brain Disorders." *Neuropsychopharmacology* 46 (2): 279–87.  
<https://doi.org/10.1038/s41386-020-0778-9>.
- Runyan, Caroline A., James Schummers, Audra Van Wart, Sandra J. Kuhlman, Nathan R. Wilson, Z. Josh Huang, and Mriganka Sur. 2010. "Response Features of Parvalbumin-Expressing Interneurons Suggest Precise Roles for Subtypes of Inhibition in Visual Cortex." *Neuron* 67 (5): 847–57. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.006>.
- Sagan, Lynn. 1967. "On the Origin of Mitosing Cells." *Journal of Theoretical Biology* 14 (3): 225–IN6. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3).
- Sage-Schwaede, Abigail, Kristin Engelstad, Rachel Salazar, Angela Curcio, Alexander Khandji, James H. Garvin Jr, and Darryl C. De Vivo. 2019. "Exploring MTOR Inhibition as Treatment for Mitochondrial Disease." *Annals of Clinical and Translational Neurology* 6 (9): 1877–81. <https://doi.org/10.1002/acn3.50846>.
- Salama, Mohamed, Sara El-Desouky, Aziza Alsayed, Mahmoud El-Hussiny, Abdelrahman Moustafa, Yasmeen Taalab, and Wael Mohamed. 2019. "FOXRED1 Silencing in Mice: A Possible Animal Model for Leigh Syndrome." *Metabolic Brain Disease* 34 (1): 367–72. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0334-z>.
- Sanz, Elisenda, Jonathan C. Bean, Daniel P. Carey, Albert Quintana, and G. Stanley



## Referències

- McKnight. 2019. "RiboTag: Ribosomal Tagging Strategy to Analyze Cell-Type-Specific mRNA Expression In Vivo." *Current Protocols in Neuroscience* 88 (1): 139–48. <https://doi.org/10.1002/cpns.77>.
- Sanz, Elisenda, Albert Quintana, Jennifer D. Deem, Robert A. Steiner, Richard D. Palmiter, and G. Stanley McKnight. 2015. "Fertility-Regulating Kiss1 Neurons Arise from Hypothalamic Pomc-Expressing Progenitors." *Journal of Neuroscience* 35 (14): 5549–56. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3614-14.2015>.
- Sanz, Elisenda, Linghai Yang, Thomas Su, David R. Morris, G. Stanley McKnight, and Paul S. Amieux. 2009. "Cell-Type-Specific Isolation of Ribosome-Associated mRNA from Complex Tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (33): 13939–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907143106>.
- Scaglia, Fernando, Lee-Jun C Wong, Georgirene D. Vladutiu, and Jill V. Hunter. 2005. "Predominant Cerebellar Volume Loss as a Neuroradiologic Feature of Pediatric Respiratory Chain Defects." *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 26 (7): 1675–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16091512>.
- Schröder, Hannsjörg, Natasha Moser, and Stefan Huggenberger. 2020. *Neuroanatomy of the Mouse. Neuroanatomy of the Mouse*. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-19898-5>.
- Schubert Baldo, Manuela, and Laura Vilarinho. 2020. "Molecular Basis of Leigh Syndrome: A Current Look." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 15 (1): 31. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-1297-9>.
- Schwaller, B., J. Dick, G. Dhoot, S. Carroll, G. Vrbova, P. Nicotera, D. Pette, et al. 1999. "Prolonged Contraction-Relaxation Cycle of Fast-Twitch Muscles in Parvalbumin Knockout Mice." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 276 (2): C395–403. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.2.C395>.
- Seibenhener, Michael L., and Michael C. Wooten. 2015. "Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice." *Journal of Visualized Experiments*, no. 96 (February): 1–6. <https://doi.org/10.3791/52434>.
- Seifert, Gerald, Karl Schilling, and Christian Steinhäuser. 2006. "Astrocyte Dysfunction in Neurological Disorders: A Molecular Perspective." *Nature Reviews Neuroscience* 7 (3): 194–206. <https://doi.org/10.1038/nrn1870>.
- Sharma, Vijendra, Rapita Sood, Abdessattar Khlaifia, Mohammad Javad Eslamizade, Tzu-Yu Hung, Danning Lou, Azam Asgarihafshejani, et al. 2020. "EIF2 $\alpha$  Controls Memory Consolidation via Excitatory and Somatostatin Neurons." *Nature* 586 (7829): 412–16. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2805-8>.
- Sheng, Zu-Hang, and Qian Cai. 2012. "Mitochondrial Transport in Neurons: Impact on Synaptic Homeostasis and Neurodegeneration." *Nature Reviews Neuroscience* 13 (2): 77–93. <https://doi.org/10.1038/nrn3156>.
- Shiotsuki, Hiromi, Kenji Yoshimi, Yasushi Shimo, Manabu Funayama, Yukio Takamatsu, Kazutaka Ikeda, Ryosuke Takahashi, Shigeru Kitazawa, and Nobutaka Hattori. 2010. "A Rotarod Test for Evaluation of Motor Skill Learning." *Journal of Neuroscience Methods* 189 (2): 180–85. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026>.
- Siemian, Justin N., Sarah Sarsfield, and Yeka Aponte. 2020. "Glutamatergic Fast-Spiking Parvalbumin Neurons in the Lateral Hypothalamus: Electrophysiological Properties to Behavior." *Physiology & Behavior* 221 (November 2019): 112912. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112912>.
- Silberberg, Gilad, and Henry Markram. 2007. "Disynaptic Inhibition between Neocortical

- Pyramidal Cells Mediated by Martinotti Cells." *Neuron* 53 (5): 735–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.012>.
- Sillen, Machteld, and Paul J. Declerck. 2021. "Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI): An Updated Narrative Review." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (7): 3670. <https://doi.org/10.3390/ijms22073670>.
- Silva-Pinheiro, Pedro, Raffaele Cerutti, Marta Luna-Sanchez, Massimo Zeviani, and Carlo Viscomi. 2020. "A Single Intravenous Injection of AAV-PHP.B-HNDUFS4 Ameliorates the Phenotype of Ndufs4 Mice." *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 17 (June): 1071–78. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.04.026>.
- Silva, Catia AP, Annik Yalnizyan-Carson, M Victoria Fernández Busch, Mike van Zwieten, Matthijs Verhage, and Christian Lohmann. 2021. "Activity-Dependent Regulation of Mitochondrial Motility in Developing Cortical Dendrites." *ELife* 10 (September): 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.62091>.
- Silverman, Jill L., Mu Yang, Catherine Lord, and Jacqueline N. Crawley. 2010. "Behavioural Phenotyping Assays for Mouse Models of Autism." *Nature Reviews Neuroscience* 11 (7): 490–502. <https://doi.org/10.1038/nrn2851>.
- Skladal, Daniela, Jane Halliday, and David R. Thorburn. 2003. "Minimum Birth Prevalence of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders in Children." *Brain* 126 (8): 1905–12. <https://doi.org/10.1093/brain/awg170>.
- Sofou, Kalliopi, Irenaeus F M De Coo, Pirjo Isohanni, Elsebet Ostergaard, Karin Naess, Linda De Meirleir, Charalampos Tzoulis, et al. 2014. "A Multicenter Study on Leigh Syndrome: Disease Course and Predictors of Survival." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 9 (1): 52. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-9-52>.
- Sofou, Kalliopi, Irenaeus F M de Coo, Elsebet Ostergaard, Pirjo Isohanni, Karin Naess, Linda De Meirleir, Charalampos Tzoulis, et al. 2018. "Phenotype-Genotype Correlations in Leigh Syndrome: New Insights from a Multicentre Study of 96 Patients." *Journal of Medical Genetics* 55 (1): 21–27. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104891>.
- Sofroniew, Michael V. 2009. "Molecular Dissection of Reactive Astrogliosis and Glial Scar Formation." *Trends in Neurosciences* 32 (12): 638–47. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>.
- Sokolov, Arseny A. 2018. "The Cerebellum in Social Cognition." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12 (June). <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00145>.
- Souza, P.V.S., Thiago Bortholin, Carlos Alberto Castro Teixeira, Daniel Delgado Seneor, Vitor Dias Gomes Barrios Marin, Renan Braido Dias, Igor Braga Farias, et al. 2019. "Leigh Syndrome Caused by Mitochondrial DNA-Maintenance Defects Revealed by Whole Exome Sequencing." *Mitochondrion* 49 (July): 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.06.008>.
- Spampinato, Danny A., Pablo A. Celnik, and John C. Rothwell. 2020. "Cerebellar-Motor Cortex Connectivity: One or Two Different Networks?" *Journal of Neuroscience* 40 (21): 4230–39. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2397-19.2020>.
- Spinazzi, Marco, Enrico Radaelli, Katrien Horr , Amaia M. Arranz, Natalia V. Gounko, Patrizia Agostinis, Teresa Mendes Maia, et al. 2019. "PARL Deficiency in Mouse Causes Complex III Defects, Coenzyme Q Depletion, and Leigh-like Syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (1): 277–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811938116>.
- Starkov, Anatoly A. 2004. "Mitochondrial -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species." *Journal of Neuroscience* 24 (36): 7779–88. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004>.

## Referències

- Stedehouder, J., J. J. Couey, D. Brizee, B. Hosseini, J. A. Slotman, C. M. F. Dirven, G. Shpak, A. B. Houtsmuller, and S. A. Kushner. 2017. "Fast-Spiking Parvalbumin Interneurons Are Frequently Myelinated in the Cerebral Cortex of Mice and Humans." *Cerebral Cortex* 27 (10): 5001–13. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx203>.
- Stokes, Caleb C.A., and Jeffrey S. Isaacson. 2010. "From Dendrite to Soma: Dynamic Routing of Inhibition by Complementary Interneuron Microcircuits in Olfactory Cortex." *Neuron* 67 (3): 452–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.029>.
- Stover, Kurt R., Mackenzie A. Campbell, Christine M. Van Winssen, and Richard E. Brown. 2015. "Analysis of Motor Function in 6-Month-Old Male and Female 3xTg-AD Mice." *Behavioural Brain Research* 281 (March): 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.11.046>.
- Strick, Peter L., Richard P. Dum, and Julie A. Fiez. 2009. "Cerebellum and Nonmotor Function." *Annual Review of Neuroscience* 32 (1): 413–34. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125606>.
- Subhramanyam, Charannya Sozheesvari, Cheng Wang, Qidong Hu, and S. Thameem Dheen. 2019. "Microglia-Mediated Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 94 (May): 112–20. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.05.004>.
- Südhof, Thomas C. 2021. "The Cell Biology of Synapse Formation." *Journal of Cell Biology* 220 (7): 1–18. <https://doi.org/10.1083/jcb.202103052>.
- Swanson, Raymond, Weihai Ying, and Tiina Kauppinen. 2004. "Astrocyte Influences on Ischemic Neuronal Death." *Current Molecular Medicine* 4 (2): 193–205. <https://doi.org/10.2174/1566524043479185>.
- Szabó, Csaba. 2005. "Mechanisms of Cell Necrosis." *Critical Care Medicine* 33 (Suppl): S530–34. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000187002.88999.CF>.
- Takahashi, Aki, Kazuki Nagayasu, Naoya Nishitani, Shuji Kaneko, and Tsuyoshi Koide. 2014. "Control of Intermale Aggression by Medial Prefrontal Cortex Activation in the Mouse." Edited by Allan Siegel. *PLoS ONE* 9 (4): e94657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094657>.
- Takahashi, Eiki, Kimie Niimi, and Chitoshi Itakura. 2009. "Motor Coordination Impairment in Aged Heterozygous Rolling Nagoya, Cav2.1 Mutant Mice." *Brain Research* 1279 (July): 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.016>.
- Takeuchi, T, and Y Ohtsuki. 2001. "Review Recent Progress in T-Cadherin (CDH13, H-Cadherin) Research," 1287–93. <https://doi.org/10.14670/HH-16.1287>.
- Takumi, Toru, Kota Tamada, Fumiyuki Hatanaka, Nobuhiro Nakai, and Patrick F. Bolton. 2020. "Behavioral Neuroscience of Autism." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 110 (May 2018): 60–76. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.012>.
- Tamamaki, Nobuaki, and Ryohei Tomioka. 2010. "Long-Range GABAergic Connections Distributed throughout the Neocortex and Their Possible Function." *Frontiers in Neuroscience* 4 (DEC): 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2010.00202>.
- Tamamaki, Nobuaki, Yuchio Yanagawa, Ryohei Tomioka, Jun-Ichi Miyazaki, Kunihiro Obata, and Takeshi Kaneko. 2003. "Green Fluorescent Protein Expression and Colocalization with Calretinin, Parvalbumin, and Somatostatin in the GAD67-GFP Knock-in Mouse." *The Journal of Comparative Neurology* 467 (1): 60–79. <https://doi.org/10.1002/cne.10905>.
- Taniguchi, Hiroki, Miao He, Priscilla Wu, Sangyong Kim, Raehum Paik, Ken Sugino, Duda Kvitsani, et al. 2011. "A Resource of Cre Driver Lines for Genetic Targeting of

- GABAergic Neurons in Cerebral Cortex." *Neuron* 71 (6): 995–1013.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.026>.
- Terburgh, Karin, Janeé Coetzer, Jeremy Z. Lindeque, Francois H. van der Westhuizen, and Roan Louw. 2021. "Aberrant BCAA and Glutamate Metabolism Linked to Regional Neurodegeneration in a Mouse Model of Leigh Syndrome." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1867 (5): 166082.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166082>.
- Terzenidou, Maria Eirini, Aikaterini Segklia, Toshimi Kano, Florentia Papastefanaki, Alexandros Karakostas, Maria Charalambous, Fotis Ioakeimidis, et al. 2017. "Novel Insights into SLC25A46-Related Pathologies in a Genetic Mouse Model." Edited by Edmund Kunji. *PLOS Genetics* 13 (4): e1006656.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006656>.
- Thomas, Alexia, April Burant, Nghiem Bui, Deanna Graham, Lisa A. Yuva-Paylor, and Richard Paylor. 2009. "Marble Burying Reflects a Repetitive and Perseverative Behavior More than Novelty-Induced Anxiety." *Psychopharmacology* 204 (2): 361–73.  
<https://doi.org/10.1007/s00213-009-1466-y>.
- Tiger, Carl-Fredrik, Francoise Fougerousse, Gunilla Grundström, Teet Velling, and Donald Gullberg. 2001. "A11 $\beta$ 1 Integrin Is a Receptor for Interstitial Collagens Involved in Cell Migration and Collagen Reorganization on Mesenchymal Nonmuscle Cells." *Developmental Biology* 237 (1): 116–29. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0363>.
- Tikidji-Hamburyan, Alexandra, Katja Reinhard, Hartwig Seitter, Anahit Hovhannisyan, Christopher A. Procyk, Annette E. Allen, Martin Schenk, Robert J. Lucas, and Thomas A. Münch. 2015. "Retinal Output Changes Qualitatively with Every Change in Ambient Illuminance." *Nature Neuroscience* 18 (1): 66–74. <https://doi.org/10.1038/nn.3891>.
- Triarhou, Lazaros C. 2021. "Pre-Brodmann Pioneers of Cortical Cytoarchitectonics I: Theodor Meynert, Vladimir Betz and William Bevan-Lewis." *Brain Structure and Function* 226 (1): 49–67. <https://doi.org/10.1007/s00429-020-02168-6>.
- Tsai, Peter T., Court Hull, YunXiang Chu, Emily Greene-Colozzi, Abbey R. Sadowski, Jarrett M. Leech, Jason Steinberg, Jacqueline N. Crawley, Wade G. Regehr, and Mustafa Sahin. 2012. "Autistic-like Behaviour and Cerebellar Dysfunction in Purkinje Cell Tsc1 Mutant Mice." *Nature* 488 (7413): 647–51. <https://doi.org/10.1038/nature11310>.
- Tsubaki, Haruka, Ikuo Tooyama, and Douglas Gordon Walker. 2020. "Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) with Focus on Brain and Neurodegenerative Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (24): 9357.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21249357>.
- Tukker, John J., Pablo Fuentealba, Katja Hartwich, Peter Somogyi, and Thomas Klausberger. 2007. "Cell Type-Specific Tuning of Hippocampal Interneuron Firing during Gamma Oscillations In Vivo." *Journal of Neuroscience* 27 (31): 8184–89.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1685-07.2007>.
- Turturici, Giuseppina, Gabriella Sconzo, and Fabiana Geraci. 2011. "Hsp70 and Its Molecular Role in Nervous System Diseases." *Biochemistry Research International* 2011: 1–18.  
<https://doi.org/10.1155/2011/618127>.
- Uusisaari, Marylka, and Erik De Schutter. 2011. "The Mysterious Microcircuitry of the Cerebellar Nuclei." *The Journal of Physiology* 589 (14): 3441–57.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.201582>.
- Vafai, Scott B., and Vamsi K. Mootha. 2012. "Mitochondrial Disorders as Windows into an Ancient Organelle." *Nature* 491 (7424): 374–83.  
<https://doi.org/10.1038/nature11707>.

## Referències

- . 2013. “A Common Pathway for a Rare Disease?” *Science* 342 (6165): 1453–54. <https://doi.org/10.1126/science.1248449>.
- Valsecchi, Federica, Sander Grefte, Peggy Roestenberg, Jori Joosten-Wagenaars, Jan A.M. Smeitink, Peter H.G.M. Willems, and Werner J.H. Koopman. 2013. “Primary Fibroblasts of NDUFS4–/– Mice Display Increased ROS Levels and Aberrant Mitochondrial Morphology.” *Mitochondrion* 13 (5): 436–43. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.12.001>.
- Verkaart, Sjoerd, Werner J.H. Koopman, Sjenet E. van Emst-de Vries, Leo G.J. Nijtmans, Lambertus W.P.J. van den Heuvel, Jan A.M. Smeitink, and Peter H.G.M. Willems. 2007. “Superoxide Production Is Inversely Related to Complex I Activity in Inherited Complex I Deficiency.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1772 (3): 373–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.12.009>.
- Verkhatsky, Alexei, and Maiken Nedergaard. 2018. “Physiology of Astroglia.” *Physiological Reviews* 98 (1): 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>.
- Viscomi, Carlo, Emanuela Bottani, Gabriele Civiletto, Raffaele Cerutti, Maurizio Moggio, Gigliola Fagiolari, Eric A. Schon, Costanza Lamperti, and Massimo Zeviani. 2011. “In Vivo Correction of COX Deficiency by Activation of the AMPK/PGC-1 $\alpha$  Axis.” *Cell Metabolism* 14 (1): 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.011>.
- Vogel, Michael W., Jean Caston, Michisuke Yuzaki, and Jean Mariani. 2007. “The Lurcher Mouse: Fresh Insights from an Old Mutant.” *Brain Research* 1140 (1): 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.086>.
- Waites, Clarissa L., Ann Marie Craig, and Craig C. Garner. 2005. “MECHANISMS OF VERTEBRATE SYNAPTOGENESIS.” *Annual Review of Neuroscience* 28 (1): 251–74. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144336>.
- Walker, Melissa A., Maria Miranda, Amanda Allred, and Vamsi K. Mootha. 2022. “On the Dynamic and Even Reversible Nature of Leigh Syndrome: Lessons from Human Imaging and Mouse Models.” *Current Opinion in Neurobiology* 72 (February): 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.09.006>.
- Wang, Xuekun, and Mario Andrea Marchisio. 2021. “Synthetic Polycistronic Sequences in Eukaryotes.” *Synthetic and Systems Biotechnology* 6 (4): 254–61. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.09.003>.
- Wang, Yiran, Ying Wang, Veni Bharti, Hong Zhou, Vanessa Hoi, Hua Tan, Zijian Wu, Pandian Nagakannan, Eftekhari Eftekharpour, and Jun-Feng Wang. 2019. “Upregulation of Thioredoxin-Interacting Protein in Brain of Amyloid- $\beta$  Protein Precursor/Presenilin 1 Transgenic Mice and Amyloid- $\beta$  Treated Neuronal Cells.” Edited by Wolff Kirsch. *Journal of Alzheimer's Disease* 72 (1): 139–50. <https://doi.org/10.3233/JAD-190223>.
- Want, J. J. L. van der, N. M. Gerrits, and J. Voogd. 1987. “Autoradiography of Mossy Fiber Terminals in the Fastigial Nucleus of the Cat.” *The Journal of Comparative Neurology* 258 (1): 70–80. <https://doi.org/10.1002/cne.902580105>.
- Wedatilake, Yehani, Ruth M Brown, Robert McFarland, Joy Yaplito-Lee, Andrew A M Morris, Mike Champion, Phillip E. Jardine, et al. 2013. “SURF1 Deficiency: A Multi-Centre Natural History Study.” *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8 (1): 96. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-96>.
- Weiss, Linnea A., and Marta Nieto. 2019. “The Crux of Cux Genes in Neuronal Function and Plasticity.” *Brain Research* 1705 (February): 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.044>.
- Westman, Johannes, Sergio Grinstein, and Pedro Elias Marques. 2020. “Phagocytosis of

- Necrotic Debris at Sites of Injury and Inflammation." *Frontiers in Immunology* 10 (January). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03030>.
- Whissell, Paul D., Jee Yoon Bang, Ikram Khan, Yu-Feng Xie, Gustavo M. Parfitt, Martine Grenon, Nicholas W. Plummer, Patricia Jensen, Robert P. Bonin, and Jun Chul Kim. 2019. "Selective Activation of Cholecystokinin-Expressing GABA (CCK-GABA) Neurons Enhances Memory and Cognition." *Eneuro* 6 (1): ENEURO.0360-18.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0360-18.2019>.
- Whissell, Paul D., Janine D. Cajanding, Nicole Fogel, and Jun Chul Kim. 2015. "Comparative Density of CCK- and PV-GABA Cells within the Cortex and Hippocampus." *Frontiers in Neuroanatomy* 9 (September): 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00124>.
- White, Sarah L., Veronica R. Collins, Rory Wolfe, Maureen A. Cleary, Sara Shanske, Salvatore DiMauro, Hans-Henrik M. Dahl, and David R. Thorburn. 1999. "Genetic Counseling and Prenatal Diagnosis for the Mitochondrial DNA Mutations at Nucleotide 8993." *The American Journal of Human Genetics* 65 (2): 474–82. <https://doi.org/10.1086/302488>.
- Willems, J L, L. A. H. Monnens, J. M. F. Trijbels, J H Veerkamp, A. E. F. H. Meyer, K van Dam, and U van Haelst. 1977. "Leigh's Encephalomyelopathy in a Patient With Cytochrome c Oxidase Deficiency in Muscle Tissue." *Pediatrics* 60 (6): 850–57. <https://doi.org/10.1542/peds.60.6.850>.
- Wöhr, M., D. Orduz, P. Gregory, H. Moreno, U. Khan, K. J. Vörckel, D. P. Wolfer, et al. 2015. "Lack of Parvalbumin in Mice Leads to Behavioral Deficits Relevant to All Human Autism Core Symptoms and Related Neural Morphofunctional Abnormalities." *Translational Psychiatry* 5 (3): e525–e525. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.19>.
- Wojtala, Aleksandra, Agnieszka Karkucinska-Wieckowska, Vilma A. Sardao, Joanna Szczepanowska, Pawel Kowalski, Maciej Pronicki, Jerzy Duszynski, and Mariusz R. Wieckowski. 2017. "Modulation of Mitochondrial Dysfunction-Related Oxidative Stress in Fibroblasts of Patients with Leigh Syndrome by Inhibition of Prooxidative P66Shc Pathway." *Mitochondrion* 37 (November): 62–79. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.07.002>.
- Woller, Sarah A, Kelly A Eddinger, Maripat Corr, and Tony L Yaksh. 2012. "An Overview of Pathways Encoding Nociception." *Clinical and Experimental Rheumatology* 35 Suppl 1 (5): 40–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28967373>.
- Wong, Vicky L.Y., Florence M. Hofman, Hidemi Ishii, and Mark Fisher. 1991. "Regional Distribution of Thrombomodulin in Human Brain." *Brain Research* 556 (1): 1–5. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90540-C](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90540-C).
- Woodworth, Mollie B, Luciano Custo Greig, Arnold R Kriegstein, and Jeffrey D Macklis. 2012. "SnapShot: Cortical Development." *Cell* 151 (4): 918-918.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.004>.
- Worsley, Helen E., R. W. Brookfield, J. S. Elwood, R. L. Noble, and W. H. Taylor. 1965. "Lactic Acidosis with Necrotizing Encephalopathy in Two Sibs." *Archives of Disease in Childhood* 40 (213): 492–501. <https://doi.org/10.1136/adc.40.213.492>.
- Yagi, Takeshi. 2008. "Clustered Protocadherin Family." *Development, Growth & Differentiation* 50 (SUPPL. 1): S131–40. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.00991.x>.
- Yang, Hua, Sonja Brosel, Rebeca Acin-Perez, Vesna Slavkovich, Ichizo Nishino, Raffay Khan, Ira J. Goldberg, Joseph Graziano, Giovanni Manfredi, and Eric A. Schon. 2010. "Analysis of Mouse Models of Cytochrome c Oxidase Deficiency Owing to Mutations in Sco2." *Human Molecular Genetics* 19 (1): 170–80.

## Referències

- <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp477>.
- Yang, Xiaokui, Jiandong Wang, Ying Zhou, Yamei Wang, Shuyu Wang, and Weiyuan Zhang. 2012. "Hsp70 Promotes Chemoresistance by Blocking Bax Mitochondrial Translocation in Ovarian Cancer Cells." *Cancer Letters* 321 (2): 137–43. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.030>.
- Yizhar, Ofer, Lief E. Fenno, Matthias Prigge, Franziska Schneider, Thomas J. Davidson, Daniel J. O'Shea, Vikaas S. Sohal, et al. 2011. "Neocortical Excitation/Inhibition Balance in Information Processing and Social Dysfunction." *Nature* 477 (7363): 171–78. <https://doi.org/10.1038/nature10360>.
- Yokota, Yukako, H. T. Ghashghaei, Christine Han, Hannah Watson, Kenneth J. Campbell, and E.S. Anton. 2007. "Radial Glial Dependent and Independent Dynamics of Interneuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex." Edited by Tailoi Chan-Ling. *PLoS ONE* 2 (8): e794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000794>.
- Yousaf, Tayyabah, George Dervenoulas, and Marios Politis. 2018. "Advances in MRI Methodology." In *International Review of Neurobiology*, 1st ed., 141:31–76. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2018.08.008>.
- Yue, Yuanlei, Pan Xu, Zhichao Liu, Xiaoqian Sun, Juntao Su, Hongfei Du, Lingling Chen, et al. 2021. "Motor Training Improves Coordination and Anxiety in Symptomatic Mecp2 - Null Mice despite Impaired Functional Connectivity within the Motor Circuit." *Science Advances* 7 (43). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf7467>.
- Yuste, Rafael, Michael Hawrylycz, Nadia Aalling, Argel Aguilar-Valles, Detlev Arendt, Ruben Armananzas Arnedillo, Giorgio A. Ascoli, et al. 2020. "A Community-Based Transcriptomics Classification and Nomenclature of Neocortical Cell Types." *Nature Neuroscience*, August, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0685-8>.
- Zeeuw, C. I., and A. S. Berrebi. 1996. "Individual Purkinje Cell Axons Terminate on Both Inhibitory and Excitatory Neurons in the Cerebellar and Vestibular Nuclei." *Annals of the New York Academy of Sciences* 781 (1 Lipids and Sy): 607–10. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb15736.x>.
- Zeisel, Amit, Ana B. Muñoz-Manchado, Simone Codeluppi, Peter Lönnerberg, Gioele La Manno, Anna Juréus, Sueli Marques, et al. 2015. "Cell Types in the Mouse Cortex and Hippocampus Revealed by Single-Cell RNA-Seq." *Science* 347 (6226): 1138–42. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1934>.
- Zhang, Y., Y. L. Yang, F. Sun, X. Cai, N. Qian, Y. Yuan, Z. X. Wang, et al. 2007. "Clinical and Molecular Survey in 124 Chinese Patients with Leigh or Leigh-like Syndrome." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 30 (2): 265–265. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0481-y>.
- Zheng, Nan, and Indira M. Raman. 2010. "Synaptic Inhibition, Excitation, and Plasticity in Neurons of the Cerebellar Nuclei." *The Cerebellum* 9 (1): 56–66. <https://doi.org/10.1007/s12311-009-0140-6>.
- Zhou, Mu, Maxwell D. Melin, Wei Xu, and Thomas C. Südhof. 2020. "Dysfunction of Parvalbumin Neurons in the Cerebellar Nuclei Produces an Action Tremor." *Journal of Clinical Investigation* 130 (10): 5142–56. <https://doi.org/10.1172/JCI135802>.
- Zhu, Fei, Mélissa Cizeron, Zhen Qiu, Ruth Benavides-Piccione, Maksym V. Kopanitsa, Nathan G. Skene, Babis Koniaris, et al. 2018. "Architecture of the Mouse Brain Synaptome." *Neuron* 99 (4): 781-799.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.007>.
- Zimin, Pavel I., Christian B. Woods, Albert Quintana, Jan Marino Ramirez, Philip G. Morgan, and Margaret M. Sedensky. 2016. "Glutamatergic Neurotransmission Links Sensitivity

- to Volatile Anesthetics with Mitochondrial Function." *Current Biology* 26 (16): 2194–2201. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.020>.
- Zorova, Ljubava D., Vasily A. Popkov, Egor Y. Plotnikov, Denis N. Silachev, Irina B. Pevzner, Stanislovas S. Jankauskas, Valentina A. Babenko, et al. 2018. "Mitochondrial Membrane Potential." *Analytical Biochemistry* 552 (July): 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>.





